

Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente

Comparação de métodos de identificação de bactérias floculentas presentes em ETAR

Ana Inês de Matos Domingos Braz

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do
grau de Mestre em Engenharia do Ambiente – Perfil Engenharia Sanitária

Orientador: Professora Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa

Co-orientador: Professor Doutor Mário Emanuel Campos de Sousa Diniz

Lisboa

2010

DEDICATÓRIA

...À minha mãe.

AGRADECIMENTOS

À Engenheira Eunice das Águas do Oeste, pela cedência do efluente do tanque do arejamento da ETAR Santa Cruz, utilizado em todas as análises efectuadas neste trabalho.

Ao Doutor Hugo Santos e ao Doutor José Luís Capelo, do Campus Ourense da Universidade de Vigo, onde se realizaram as análises de MALDI-TOF MS.

À professora Rita Maurício e ao professor Mário Diniz pela orientação e apoio nesta dissertação.

À D. Luísa e à D. Adélia pela ajuda no laboratório.

À Margarida Henriques pela ajuda, presença e companheirismo durante toda a elaboração desta dissertação.

À minha amiga Mafalda Dias Pinheiro, pela amizade, presença e apoio de sempre.

À minha irmã Leonor, pela disponibilidade, sempre.

RESUMO

“A unidade operacional básica de um sistema de lamas activadas é o floco” (Gray, 2004). Quando a lama e a água residual são misturadas, há uma rápida aglomeração da matéria suspensa e coloidal em flocos, que irá provocar uma queda da CBO da água residual. O crescimento de bons flocos é importante para um tratamento bem sucedido, de forma a que a matéria suspensa, coloidal ou iónica presente na água residual possa ser removida por adsorção e aglomeração. Posteriormente, se os flocos tiverem sido bem formados a separação da biomassa do efluente tratado será rápida e eficiente (Gray, 2004).

Em sistemas de tratamento de águas residuais, nomeadamente em sistemas de lamas activadas, as lamas são constituídas por uma população heterogénea de microrganismos, que está em contínua modificação, devido a alterações na composição do efluente ou dos parâmetros de funcionamento. O controlo destas alterações permite criar pressões selectivas que irão favorecer o crescimento de microrganismos desejáveis em detrimento de outros. Desta forma, a identificação dos microrganismos presentes nas lamas e das suas características metabólicas torna-se muito importante (Metcalf e Eddy, 2003; Santos Oliveira, 1982).

Este trabalho teve como objectivo a comparação de métodos de identificação de bactérias formadoras de flocos. Para tal, foram comparados três métodos (i) a observação microscópica, (ii) os API e o (iii) MALDI-TOF MS.

A observação microscópica realizada, sem coloração, e com coloração com hematoxilina e eosina e coloração de Gram, permitiu observar as características da lama, e ir avaliando as culturas que se foram realizando ao longo do estudo. Através deste método foi possível verificar que não se atingiram culturas puras do microrganismo predominante para posterior identificação.

No método de API, utilizou-se o kit API 20 E, que permitiu chegar à identificação presumível de dois possíveis géneros de bactérias, para as amostras de culturas finais obtidas, o género *Serratia* e o género *Kluyvera*, com uma percentagem de probabilidade bastante elevada e segundo dois programas de identificação, o apiweb da BioMérieux e o ABIS online.

Através do método de MALDI-TOF MS, identificaram-se duas espécies possíveis, *Lentisphaera araneosa* e *Serratia* sp. através do software de identificação Mascot (Matrix Science).

Considera-se que a não obtenção de culturas puras foi a maior dificuldade e limitação deste trabalho, uma vez que é fundamental a obtenção de culturas puras, para a obtenção de resultados 100 % conclusivos. Deste modo, considera-se que os resultados obtidos através dos métodos de API e MALDI-TOF MS possam estar mascarados devido a esta limitação. Essencialmente e em resumo, seria necessária a elaboração e aplicação de uma estratégia de purificação mais específica, de forma a seleccionarem-se os organismos pretendidos e obterem-se culturas puras.

Em relação aos métodos utilizados, pode concluir-se que qualquer um dos métodos é útil e importante para a identificação de microrganismos, e que estes se complementam entre si.

Assim, a microscopia óptica é útil numa análise menos detalhada e complexa de amostras, e os API conseguem fornecer uma informação mais completa e precisa sobre os microrganismos a identificar. Por fim, o MALDI-TOF MS fornece informação muito detalhada e complexa dos microrganismos. Desta forma, considera-se que primeiramente em qualquer trabalho é extremamente importante definir a qualidade e o grau de detalhe da informação pretendida, dado que diferentes métodos fornecem diferentes níveis de detalhe de informação.

ABSTRACT

“The basic operational unit of an activated sludge system is the floc” (Gray, 2004). When the sludge and the wastewater are mixed, a rapid agglomeration of suspended and colloidal matter in flocs occurs, which results in a fall in the wastewater’s BOD. Good flocculant growth is important for the success of the treatment, so that suspended, colloidal or ionic matter present in the wastewater can be removed by adsorption and agglomeration. Later, if the flocs have been well formed, the separation of the biomass from the treated effluent will be quick and efficient (Gray, 2004).

In wastewater treatment systems, specifically in activated sludge systems, the sludge is composed of a heterogeneous population of microorganisms, which is in continuous modification, due to changes in the composition of the effluent or in the operating parameters. The control of those changes allows creating selective pressures that will advantage the growth of desirable microorganisms instead of others. Thus, the identification of microorganisms present in sludge and their metabolic characteristics becomes very important (Metcalf e Eddy, 2003; Santos Oliveira, 1982).

The aim of this study was to compare methods for the identification of floc-forming bacteria. To this end, there were compared three methods (i) microscopic observation, (ii) API and (iii) MALDI-TOF MS.

The performed microscopic observation, without staining, and with hematoxylin and eosin staining and Gram staining, allowed the observation of the characteristics of the sludge, and the evaluation of the cultures that were been doing during the study. Through this method, it was possible to verify that was not reached pure cultures of the predominant microorganism for later identification.

For the API method, it was used the API 20 E kit, that allowed to reach the presumptive identification of two possible bacteria genus, in the final culture samples obtained, the *Serratia* genus and the *Kluyvera* genus, with a very high percentage of probability and using two identification programs, the apiweb BioMérieux and the ABIS online.

With the MALDI-TOF MS method, it was identified two possible species, *Lentisphaera araneosa* and *Serratia* sp., using the identification software Mascot (Matrix Science).

It is considered that the non-achievement of pure cultures was the biggest difficulty and limitation of this work. It is essential to achieve pure cultures, to obtain 100% conclusive results. Thus, it is considered that the results obtained using the API and MALDI-TOF MS methods can be masked due to this limitation. Essentially and summarizing, the development

and implementation of a more specific purification strategy would be necessary in order to select the desired organisms and to obtain pure cultures.

Regarding the used methods, it can be concluded that either method is useful and important for the identification of microorganisms, and they complement each other.

Thus, the optical microscopy is useful in a less detailed and complex analysis of samples, and the API can provide a more complete and accurate information on the microorganisms to be identified. Finally, the MALDI-TOF MS provides very detailed and complex information about the microorganisms. Thus, it is considered that first, in any work, it is extremely important to define the quality and degree of detail of the desired information, because different methods provide different levels of information detail.

SIMBOLOGIA E NOTAÇÕES

API – Índice de Perfil Analítico

ATP – Adenosina Trifosfato

CBO₅ – Carência Bioquímica de Oxigênio de 5 dias

CO₂ – Dióxido de carbono

CQO – Carência Química de Oxigênio

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DSVI – “Diluted Sludge Volume Index”

EEC – Comunidade Europeia Económica

ECP – “ExtraCellular Polymers”

EPS – “Extracellular Polymeric Substances”

ESI – “ElectroSpray Ionisation”

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

EUA – Estados Unidos da América

F/M – “Food (F) to Microorganism (M) ratio”

IL – Idade de Lamas

KOH – Hidróxido de Potássio

MALDI – “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation”

MS – Espectrometria de massa

N – Azoto

N₂ – Azoto elementar

NaCl – Cloreto de Sódio

NH₃ – Amónia

NO₂ – Nitritos

NO₃ – Nitrato

O₂ – Oxigénio

OD – Oxigénio dissolvido

P – Fósforo

PO₄ – Fosfato

Q – Caudal

Q_r – Caudal de recirculação

RNA – Ácido Ribonucleico

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossómico

SDI – Índice de Densidade das Lamas

SO₄ – Sulfato

SST – Sólidos Suspensos Totais

SSV – Sólidos Suspensos Voláteis

SSVI – “Stirred Specific Volume Index”

SVI – Índice de Volume de Lamas

SWOT – Pontos fortes, Pontos fracos, Oportunidades e Ameaças

TOF – “Time-Of-Flight”

TRH – Tempo de retenção Hidráulico

UV – Ultravioleta

Zn – Zinco

ZSV – Velocidade de Sedimentação

ÍNDICE GERAL

1. OBJECTIVOS E ESTRUTURA DO TRABALHO	1
1.1. Objectivos	1
1.2. Organização e estrutura do trabalho	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Tratamento de águas residuais	3
2.1.1. Sistemas de tratamento biológico	6
2.1.1.1. Lamas activadas.....	7
2.2. Controlo de uma ETAR de lamas activadas.....	10
2.2.1. Monitorização de uma ETAR	10
2.2.2. Parâmetros de controlo do processo	12
2.2.2.1. Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	12
2.2.2.2. Sedimentabilidade das lamas	13
2.2.2.2.1. Índice de Volume de Lamas (SVI) e Índice de Densidade de Lamas (SDI)	13
2.2.2.2.2. “Stirred Specific Volume Index” (SSVI)	14
2.2.2.2.3. “Diluted Sludge Volume Index” (DSVI).....	14
2.2.2.2.4. Velocidade de sedimentação (ZSV).....	15
2.2.2.3. Idade de Lamas (IL)	16
2.2.2.4. Tempo de retenção hidráulico (TRH).....	17
2.2.2.5. Carga orgânica volúmica.....	17
2.2.2.6. Factor de Carga Mássica ou razão F/M	17
2.2.2.7. Recirculação das lamas	19
2.2.3. Outros factores que afectam o processo	20
2.2.3.1. Necessidades de nutrientes	20
2.2.3.2. Temperatura	20

2.2.3.3.	pH	20
2.2.3.4.	Oxigénio dissolvido (OD)	21
2.2.3.5.	Mistura e arejamento	21
2.3.	Organismos formadores de flocos	22
2.3.1.	Biofloculação.....	22
2.3.2.	Bactérias	27
2.3.2.1.	Parede celular das bactérias	28
2.3.2.2.	Bactérias formadoras de flocos	29
2.4.	Meios de cultura.....	30
2.4.1.	Técnicas de assepsia	31
2.4.2.	Preparação e distribuição de meios de cultura	32
2.4.3.	Obtenção de culturas puras.....	32
2.5.	Métodos de identificação de bactérias	34
2.5.1.	Observação microscópica	35
2.5.1.1.	Colorações.....	35
2.5.1.1.1.	Coloração com hematoxilina e eosina.....	36
2.5.1.1.2.	Coloração de Gram	36
2.5.1.1.3.	Teste da potassa cáustica	37
2.5.2.	API	38
2.5.2.1.	API 20E.....	38
2.5.3.	MALDI-TOF MS	39
2.5.3.1.	Método de ionização de MALDI.....	40
2.5.3.2.	Espectrómetro de massa MALDI-TOF	42
2.5.3.3.	Preparação da amostra	43
2.5.3.3.1.	Solubilização/desnaturação das proteínas.....	45
2.5.3.3.2.	Redução das proteínas.....	45

2.5.3.3.3.	Alquilação das proteínas	45
2.5.3.3.4.	Digestão das proteínas.....	45
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1.	Amostragem	49
3.2.	Preparação de meios culturas	50
3.3.	Obtenção de culturas puras	55
3.4.	Observação microscópica e coloração	58
3.4.1.	Coloração com hematoxilina e eosina	59
3.4.2.	Coloração de Gram	59
3.5.	API	62
3.6.	MALDI-TOF MS.....	68
3.6.1.	Extracção das proteínas.....	68
3.6.2.	Preparação do gel SDS – poliacrilamida.....	69
3.6.3.	Electroforese	69
3.6.4.	Digestão das proteínas no gel.....	72
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1.	Observação microscópica	75
4.1.1.	Coloração com hematoxilina e eosina	75
4.1.2.	Coloração de Gram	76
4.2.	API	77
4.3.	MALDI-TOF MS.....	82
5.	ANÁLISES SWOT	87
6.	CONCLUSÕES.....	89
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Esquema geral de tratamento das Águas residuais	5
Figura 2.2 - Esquema das lamas activadas	10
Figura 2.3 – Relação entre a razão F/M e a taxa de metabolismo	18
Figura 2.4 – Exemplo típico de flocos: (a) Floco maduro com colonização secundária típica de lamas activadas com boas características de sedimentação	23
Figura 2.4 – Exemplo típico de flocos: (b) Flocos pequenos dispersos típicos de lamas activadas com fracas características de sedimentação	23
Figura 2.5 – Floco compacto com inclusões centrais negras	26
Figura 2.6 – Flocos com a bactéria <i>Zoogloea</i> tipicamente característica dos crescimentos em forma de dedos: (a) ampliação 200x	27
Figura 2.6 – Flocos com a bactéria <i>Zoogloea</i> tipicamente característica dos crescimentos em forma de dedos: (b) ampliação 400x	27
Figura 2.7 – Exemplo de riscado em placa	33
Figura 2.8 – Galerias API 20 E	39
Figura 2.9 – Funcionamento do MALDI	41
Figura 2.10 – (1) - ácido α -cyano-4-hydroxycinnamic (CCA); (2) - ácido 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic (SA); (3) - ácido 2,5-dihydroxybenzoic (DHB)	44
Figura 3.1 – (a) Tanque de arejamento da ETAR de Santa Cruz	49
Figura 3.1 – (b) Tanque de arejamento da ETAR de Santa Cruz	49
Figura 3.2 – (a) Decantador secundário da ETAR de Santa Cruz	50
Figura 3.2 – (b) Decantador secundário da ETAR de Santa Cruz	50
Figura 3.3 – (a) Balança analítica	51
Figura 3.3 – (b) agar da Pronagar	51
Figura 3.4 – Aquecimento da solução de meio de cultura na placa de aquecimento	51
Figura 3.5 – (a) Erlenmeyer com o meio de cultura preparado com rolha de algodão	52

Figura 3.5 – (b) Erlenmeyer com o meio de cultura preparado com rolha de algodão e cobertura de alumínio	52
Figura 3.6 – (a) Caixas de Petri envolvidas em alumínio	52
Figura 3.6 – (b) Caixas de Petri envolvidas em alumínio e Erlenmeyer com rolha de algodão e cobertura de alumínio	52
Figura 3.7 – Cesto para levar ao autoclave	53
Figura 3.8 – (a) Autoclave	53
Figura 3.8 – (b) Autoclave	53
Figura 3.9 – Meio de cultura depois de levado ao autoclave	54
Figura 3.10 – (a) Distribuição do meio de cultura pelas caixas de Petri	54
Figura 3.10 – (b) Distribuição do meio de cultura pelas caixas de Petri	54
Figura 3.11 – (a) Meio de cultura distribuído pelas caixas de Petri depois de arrefecido e solidificado	55
Figura 3.11 – (b) Caixas de Petri invertidas e identificadas	55
Figura 3.12 – (a) Inoculação em meio de cultura	55
Figura 3.12 – (b) Inoculação em meio de cultura	55
Figura 3.13 – (a) Incubadora	56
Figura 3.13 – (b) Incubadora	56
Figura 3.14 – (a) Culturas de bactérias obtidas inicialmente	56
Figura 3.14 – (b) Culturas de bactérias obtidas inicialmente	56
Figura 3.15 – (a) Eppendorf para conservação da amostra	57
Figura 3.15 – (b) Eppendorf para conservação da amostra	57
Figura 3.16 – Agitação da amostra no vortex	57
Figura 3.17 – (a) Ansa de repicagem na chama	57
Figura 3.17 – (b) A retirar do eppendorf um pouco de amostra conservada, com a ansa de repicagem	57

Figura 3.18 – (a) Re-inoculação	58
Figura 3.18 – (b) Re-inoculação	58
Figura 3.19 – (a) Microscópio óptico utilizado para examinar as lâminas	58
Figura 3.19 – (b) Microscópio óptico utilizado para examinar as lâminas	58
Figura 3.20 – (a) Preparação dos esfregaços	59
Figura 3.20 – (b) Preparação dos esfregaços	59
Figura 3.21 – Solução de hematoxilina à esquerda e solução de eosina à direita	59
Figura 3.22 – (a) Coloração com de cristal de violeta	60
Figura 3.22 – (b) Coloração com de cristal de violeta	60
Figura 3.23 – (a) Remoção do corante de cristal de violeta	60
Figura 3.23 – (b) Remoção do corante de cristal de violeta	60
Figura 3.24 – (a) Aplicação da solução de iodo de Gram	61
Figura 3.24 – (b) Aplicação da solução de iodo de Gram	61
Figura 3.25 – (a) Aplicação da solução de descoloração	61
Figura 3.25 – (b) Aplicação da solução de descoloração	61
Figura 3.26 – (a) Coloração com safranina	61
Figura 3.26 – (b) Coloração com safranina	61
Figura 3.27 – Esfregaços a secar ao ar	62
Figura 3.28 – (a) Distribuição de água destilada nos alvéolos	62
Figura 3.28 – (b) Distribuição de água destilada nos alvéolos	62
Figura 3.29 – Galerias nas caixas de incubação	63
Figura 3.30 – (a) Tubos de ensaio com 5 mL da solução de NaCl	63
Figura 3.30 – (b) Tubos de ensaio com 5 mL da solução de NaCl	63
Figura 3.31 – (a) Colheita da colónia do meio de cultura	63
Figura 3.31 – (b) Introdução no tubo de ensaio	63

Figura 3.32 – Vórtex	64
Figura 3.33 – (a) Introdução da suspensão bacteriana nos tubos da galeria	64
Figura 3.33 – (b) Aspecto das galerias depois de inoculadas	64
Figura 3.34 – (a) Frasco de óleo de parafina	65
Figura 3.34 – (b) Caixa de incubação fechada	65
Figura 3.35 – (a) Aspecto das galerias depois de 24 horas de incubação	65
Figura 3.35 – (b) Aspecto das galerias depois de 24 horas de incubação	65
Figura 3.36 – (a) Reagentes utilizados nos testes que necessitavam a adição destes	66
Figura 3.36 – (b) Reagentes utilizados nos testes complementares	66
Figura 3.37 – Aspecto das galerias após a aplicação dos reagentes necessários, e após os testes complementares NO_2 e N_2	67
Figura 3.38 – Ficha de resultados	67
Figura 3.39 – (a) Sonda de ultra sons	68
Figura 3.39 – (b) Sonda de ultra sons	68
Figura 3.40 – Placas utilizadas para fazer o gel	69
Figura 3.41 – (a) Placa de aquecimento	70
Figura 3.41 – (b) Proteínas a desnaturar na placa de aquecimento	70
Figura 3.42 – (a) Tina com câmara interna para electroforese	70
Figura 3.42 – (b) Tina com câmara interna para electroforese	70
Figura 3.43 – (a) A carregar cada um dos poços com as amostras e a mistura de proteínas padronizada	71
Figura 3.43 – (b) A carregar cada um dos poços com as amostras e a mistura de proteínas padronizada	71
Figura 3.44 – (a) Mini tanque fechado com os cabos eléctricos bem ligados e fonte de alimentação	71
Figura 3.44 – (b) Mini tanque fechado com os cabos eléctricos bem ligados e fonte de alimentação	71

Figura 3.45 – Gel na solução de descoloração	72
Figura 3.46 – (a) Banho de ultra sons	73
Figura 3.46 – (b) Banho de ultra sons	73
Figura 3.47 – (a) Placa de MALDI	74
Figura 3.47 – (b) Placa de MALDI	74
Figura 4.1 – (a) Aspecto geral da lama sem coloração (ampliação 1000x)	75
Figura 4.1 – (b) Aspecto geral da lama sem coloração (ampliação 1000x)	75
Figura 4.2 – Microrganismos visíveis com a aplicação da coloração com hematoxilina e eosina: (a) microrganismos de forma diferente e dimensão superior (ampliação 1000x)	76
Figura 4.2 – Microrganismos visíveis com a aplicação da coloração com hematoxilina e eosina: (b) microrganismos de forma diferente e dimensão inferior (ampliação 1000x)	76
Figura 4.3 – Aspecto geral da lama inicial com a aplicação da coloração de Gram (ampliação 400x)	76
Figura 4.4 – Microrganismos utilizados para identificação através dos métodos API e MALDI-TOF MS: (a) Microrganismos tipo bacilos maioritariamente Gram positivos (ampliação 1000x)	77
Figura 4.4 – Microrganismos utilizados para identificação através dos métodos API e MALDI-TOF MS: (b) Microrganismos tipo cocos maioritariamente Gram positivos(ampliação 1000x)	77
Figura 4.4 – Microrganismos utilizados para identificação através dos métodos API e MALDI-TOF MS: (c) Microrganismos tipo bacilos Gram negativos (ampliação 1000x)	77
Figura 4.5 – Aspecto das galerias após o período de incubação e a aplicação de alguns reagentes	78
Figura 4.6 – Ficha de resultados nº1 para a amostra 1	78
Figura 4.7 – Ficha de resultados nº2 para a amostra 2	79
Figura 4.8 – Ficha de resultados nº3 para a amostra 3	79
Figura 4.9 – <i>Serratia marcescens</i> com coloração de Gram (ampliação 1000x)	81

Figura 4.10 – Gel#1 – Fosforilase b (97 KDa); Albumina (66 KDa); Ovalbumina (45 KDa); Anidrase carbónica (30 KDa); Inibidor da tripsina (20,1 KDa); α -Lactoalbumina (14,4 KDa); Pista 1: Padrão LMW; Pista 2: Fracção proteínas solúveis M1; Pista 3: Fracção proteínas insolúveis M1; Pista 4: Fracção proteínas solúveis M1 (diluído 1:10); Pista 5: Fracção proteínas insolúveis M1 (diluído 1:10); Pista 6: Fracção proteínas solúveis I1 (diluído 1:10) ; Pista 7: Fracção proteínas insolúveis I1 (diluído 1:10); Pista 8: Fracção proteínas solúveis I1; Pista 9: Fracção proteínas insolúveis I184

Figura 4.11 – Espectro de massa (MS) e espectros de massa-massa (MS-MS) obtidos85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Parâmetros de controlo do processo de tratamento para cada tipo de regime de funcionamento em sistemas de lamas activadas	19
Tabela 2.2 – (continuação) Parâmetros de controlo do processo de tratamento para cada tipo de regime de funcionamento em sistemas de lamas activadas	19
Tabela 2.3 – Categorias de meios de cultura	30
Tabela 2.4 – Cores observadas durante a aplicação do método de coloração de Gram.....	37
Tabela 4.1 – Resultados da amostra 1 segundo o programa ABIS online	80
Tabela 4.2 – Resultados da amostra 2 segundo o programa ABIS online	80
Tabela 4.3 – Resultados da amostra 3 segundo o programa ABIS online	80
Tabela 4.4 – Padrão LMW (14 000 – 97 000 Da)	83
Tabela 4.5 – Correspondência e cobertura da sequência de péptidos da digestão em gel ..	86
Tabela 5.1 – Análise SWOT para o método microscopia óptica	87
Tabela 5.1 – Análise SWOT para o método API.....	88
Tabela 5.3 – Análise SWOT para o método MALDI-TOF MS	88

1. OBJECTIVOS E ESTRUTURA DO TRABALHO

1.1. Objectivos

O objectivo deste trabalho foi de comparar diferentes métodos de identificação de bactérias floculentas. Para tal, foram comparados três métodos (i) a observação microscópica, (ii) os API e (iii) o MALDI-TOF MS.

Para auxílio desta comparação, realizaram-se análises SWOT para cada um dos métodos, realçando os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças de cada um.

1.2. Organização e estrutura do trabalho

Em sistemas de tratamento de águas residuais, nomeadamente em sistemas de lamas activadas, as lamas são constituídas por uma população heterogénea de microrganismos, que está em contínua modificação, devido a alterações na composição do efluente ou dos parâmetros de funcionamento. O controlo destas alterações permite criar pressões selectivas que irão favorecer o crescimento de microrganismos desejáveis em detrimento de outros. Desta forma, a identificação dos microrganismos presentes nas lamas e das suas características metabólicas torna-se muito importante (Metcalf e Eddy, 2003; Santos Oliveira, 1982).

No capítulo 2, encontra-se a revisão da literatura para enquadramento do estudo efectuado, onde são abordados todos os assuntos relacionados com a actividade experimental desta dissertação.

No capítulo 3, descrevem-se todas as metodologias utilizadas no decorrer da actividade experimental, assim como todos os equipamentos e materiais utilizados.

No capítulo 4, mostram-se todos os resultados obtidos, bem como a sua discussão.

No capítulo 5, encontram-se análises SWOT de comparação dos métodos utilizados.

Por fim, no capítulo 6 apresentam-se as principais conclusões do trabalho e as sugestões de melhoria e aprofundamento dos métodos utilizados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Tratamento de águas residuais

O tratamento das águas residuais tem como objectivos principais:

- a conversão dos resíduos materiais presentes nas águas residuais em produtos finais oxidados estabilizados, que podem ser descarregados em segurança em águas interiores ou costeiras sem qualquer efeito ecologicamente negativo;
- proteger a saúde pública;
- reciclar e reconverter compostos valorizáveis (Gray, 2004).

Uma estação de tratamento de águas residuais engloba uma combinação de operações e processos de tratamento, ou por outras palavras é um conjunto de unidades projectadas para produzirem um efluente final com uma qualidade específica, a partir de um afluente com características conhecidas. O tratamento destas águas é essencialmente realizado com recurso a uma mistura de operações e processos unitários. Os métodos de tratamento nos quais a aplicação de forças físicas predomina são conhecidos por operações unitárias. Por outro lado, os métodos de tratamento nos quais a remoção de contaminantes é conduzida por reacções químicas ou biológicas são conhecidos por processos unitários. Na verdade, são o conjunto destas operações e processos unitários que fornecem os vários níveis de tratamento. O tipo de tratamento utilizado está dependente da natureza e características da água residual, dos objectivos de qualidade da água a tratar, do meio receptor e da diluição disponível (Gray, 2004; Metcalf e Eddy, 2003).

No entanto a abordagem sobre a diluição disponível para descargas de efluentes foi substituída pela introdução da Directiva de Tratamento de Águas Residuais Urbanas (91/271/EEC). Com esta directiva, passou a ser obrigatório o tratamento secundário para todas as descargas em águas interiores, para águas estuarinas com uma população equivalente superior a 2 000 habitantes, e para águas costeiras com uma população equivalente superior a 10 000 habitantes, independentemente da capacidade assimilativa do meio receptor. Para além disso, os critérios de qualidade da água foram definidos local e internacionalmente com vista a atingir objectivos específicos de qualidade da água (Gray, 2004).

As operações e processos unitários de tratamento da fase líquida podem ser classificados nos seguintes estágios:

– tratamento preliminar – diz respeito à remoção e desintegração de sólidos grosseiros, à remoção de areias e à separação de águas pluviais. Os óleos e gorduras são também removidos neste estágio se estiverem presentes em quantidades que se justifique. Essencialmente esta operação consiste na remoção de matéria que possa causar problemas de operação ou manutenção das operações e processos de tratamento subsequentes;

– tratamento primário (sedimentação) – diz respeito ao primeiro dos principais estágios de tratamento. É o processo pelo qual os sólidos sedimentáveis são removidos da água residual gradada. Este processo ocorre por passagem da água residual através de um tanque especialmente construído para o efeito, a uma velocidade tal que os sólidos são separados da suspensão por gravidade. Os sólidos sedimentados são colhidos e removidos na base do tanque como lamas primárias. Quando estes órgãos (decantadores primários) são operados correctamente podem reduzir significativamente a carga orgânica afluyente ao estágio de tratamento secundário. Comparando os dois processos unitários, a sedimentação é de longe mais barata do que o tratamento biológico (secundário) em termos de unidade de remoção de poluição. Por esta razão, muitas das instalações têm incorporado no seu projecto uma decantação primária. A remoção de sólidos em suspensão acontece devido a vários processos que ocorrem simultaneamente dentro de um decantador, tais como floculação, adsorção, e sedimentação. Os decantadores primários são normalmente projectados para remover entre 50 a 70% de sólidos suspensos e entre 25 a 40% de CBO_5 das águas residuais. A eficácia depende da natureza da água residual e em particular da proporção de matéria orgânica solúvel presente. O restante fluxo que não é retido no decantador primário, contém pequenas partículas e matéria em suspensão que passa para o estágio seguinte de tratamento;

– tratamento secundário (biológico) – diz respeito ao processo biológico no qual o afluyente proveniente do estágio anterior, entra num reactor de configuração especial, onde sobre condições aeróbias ou anaeróbias a matéria orgânica dissolvida e coloidal é oxidada ou incorporada nas células de microrganismos. Quando operado em condições adequadas, o reactor fornece um ambiente favorável ao desenvolvimento de populações microbianas. Este processo de tratamento ocorre essencialmente devido à actividade de bactérias que são responsáveis pelo nível trófico básico da cadeia alimentar do reactor. A conversão biológica da matéria solúvel e coloidal em biomassa microbiana densa, purifica a massa de água que terá de ser posteriormente submetida a uma sedimentação para separar os microrganismos da água. Esta sedimentação tem o nome de decantação secundária, e difere da decantação primária, na medida em que a lama formada é constituída por células biológicas em vez de sólidos grosseiros. As lamas formadas no decantador secundário, têm o nome de lamas secundárias;

– tratamento terciário – tratamento adicional ao biológico para remover CBO_5 , reduzir a concentração de sólidos em suspensão, eliminar bactérias ou patogênicos, remover compostos tóxicos específicos ou nutrientes como o fósforo ou o azoto, de forma a habilitar o efluente final ao cumprimento de características de descarga mais restritas do que as comuns, e que não são possíveis de obter apenas através de processos biológicos (Gray, 2004; Metcalf e Eddy, 2003).

O tratamento da fase sólida diz respeito ao tratamento das lamas, através de desidratação, estabilização e eliminação das lamas (Gray, 2004).

As estações de tratamento de águas residuais possuem na generalidade um esquema de tratamento como o apresentado na figura 2.1.

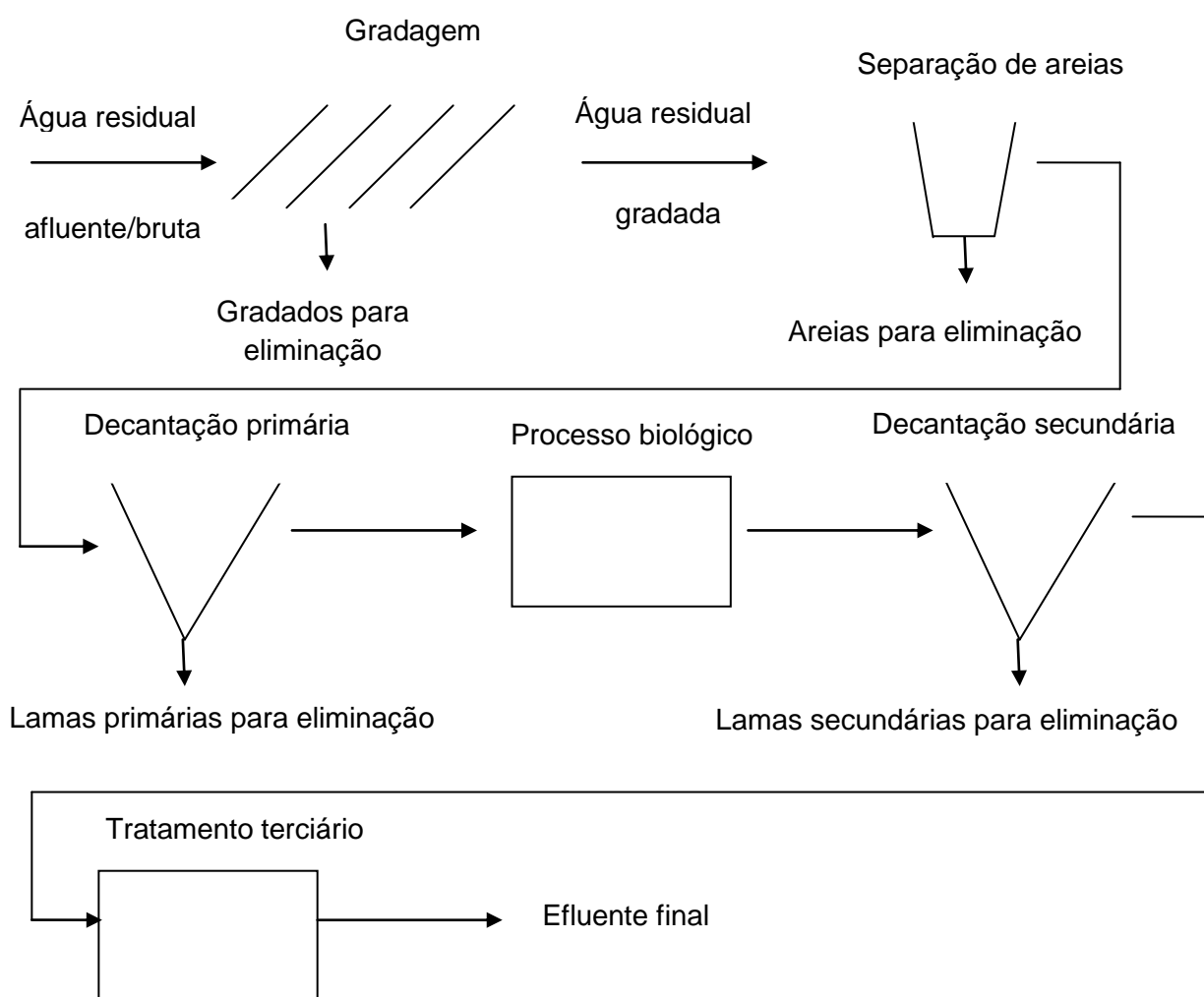


Figura 2.1 – Esquema geral de tratamento das Águas residuais (Fonte: Adaptado de Gray, 2004)

2.1.1. Sistemas de tratamento biológico

Através da implementação das operações e processos unitários adequados, e com uma análise e controlo ambiental apropriados, é possível tratar quase todas as águas residuais que contenham constituintes biodegradáveis, com tratamento biológico.

Os principais objectivos de tratamento biológico de águas residuais são de transformar através da oxidação, matéria biodegradável dissolvida e particulada em produtos finais aceitáveis, e de capturar e incorporar sólidos coloidais suspensos e não sedimentáveis em flocos ou biofilmes biológicos (Metcalf e Eddy, 2003).

Existem dois principais tipos de reactores utilizados em sistemas de tratamento biológico. Um dos tipos é aquele em que os microrganismos responsáveis pela conversão de matéria orgânica ou outros constituintes presentes nas águas residuais em gases e tecido celular, são atraídos para uma superfície fixa, como por exemplo rochas ou materiais de cerâmica ou plástico especialmente desenhados para o efeito. Os reactores onde ocorre este tipo de tratamento são denominados de sistemas de biomassa fixa, como é o caso dos leitos percoladores ou dos discos biológicos. O outro tipo de reactores é aquele em que os microrganismos estão misturados livremente na água residual. Os reactores onde ocorre este tipo de tratamento são denominados de sistemas de biomassa suspensa, como é o caso das lamas activadas (Grady e Lim, 1980; Gray, 2004; Metcalf e Eddy, 2003).

Nos sistemas de biomassa fixa, os microrganismos que estão atraídos a uma superfície fixa, têm o nome de biofilme. O meio de suporte pode estar completamente submerso no líquido ou não submerso, tendo no último caso espaços de ar ou gás acima da camada líquida do biofilme. No entanto, este tipo de sistemas tem certas vantagens e desvantagens. As suas principais desvantagens dizem respeito essencialmente à baixa eficiência da biomassa. A razão desta baixa eficiência é de que a matéria orgânica tem de ser transportada até ao biofilme para ser oxidada pelas bactérias. Este transporte é feito por difusão, que é um processo lento, estando por isso a remoção da matéria orgânica limitada pela difusão. Por outro lado, estes sistemas também oferecem várias vantagens como por exemplo, a reduzida quantidade de lamas produzida, facilidade de utilização em tratamentos de pequena escala e capacidade de suportar choques de carga (Fitch *et al.*, 1998; Grady e Lim, 1980; Henze *et al.*, 1997; Metcalf e Eddy, 2003).

Nos sistemas de biomassa suspensa, os microrganismos responsáveis pelo tratamento, são mantidos em suspensão no líquido através de métodos de mistura apropriados. Normalmente estes processos são operados com uma concentração de oxigénio dissolvido positiva, ou seja em condições aeróbias, mas podem existir casos em que se operem em condições de ausência de oxigénio, ou seja em condições anaeróbias. Os dois processos

mais comuns de biomassa suspensa são os de fluxo pistão e os de mistura completa (Metcalf e Eddy, 2003).

A separação sólido-líquido através da sedimentação é uma das operações mais críticas no tratamento de águas residuais. Neste processo os sólidos em suspensão, que são mais pesados do que a água e são habitualmente chamados de fracção decantável, são separados da água residual. Através deste processo permite-se que os sólidos em suspensão através da força da gravidade se desloquem até ao fundo do tanque para formar uma lama em condições calmas. O processo é utilizado no tratamento primário (decantação primária) com o objectivo de remover matéria orgânica e inorgânica decantável, de forma a reduzir a carga orgânica afluente ao tratamento secundário. É também utilizado no tratamento secundário, na decantação secundária para remover a matéria convertida em sólidos decantáveis durante a fase de processo biológico do tratamento. A eficiência dos decantadores é normalmente avaliada em termos de remoção de sólidos suspensos e de CBO_5 . No entanto a eficiência dos decantadores secundários está essencialmente ligada à unidade de tratamento biológico e depende da estabilidade da biomassa microbiana formada (Gray, 2004; Jin *et al.*, 2003).

Existem quatro tipos de processos de sedimentação que podem ocorrer num decantador secundário: tipo I ou sedimentação de partículas discretas; tipo II ou sedimentação de partículas floculentas; tipo III ou sedimentação zonal e tipo IV ou sedimentação de compressão. Quando as partículas estão dispersas ou em suspensão numa baixa concentração de sólidos, então ocorrem as sedimentações dos tipos I ou II. As sedimentações dos tipos III e IV ocorrem apenas quando a concentração aumenta até um ponto em que as forças das partículas ou o contacto entre estas afecta o processo normal de sedimentação. Durante o processo de sedimentação, é comum estarem a ocorrer ao mesmo tempo mais do que um tipo de sedimentação, e é mesmo possível que estejam a ocorrer as quatro em simultâneo no mesmo tanque (Gray, 2004).

2.1.1.1. Lamas activadas

O processo de lamas activadas foi desenvolvido por volta de 1913 no “Lawrence Experiment Station” em Massachusetts por Clark e Gage, e por Arden e Lockett em 1914 no “Manchester Sewage Works” em Manchester. Este processo foi assim denominado porque envolve a produção de uma massa de microrganismos activada, capaz de estabilizar resíduos sob condições aeróbias. As lamas activadas são o processo mais frequentemente utilizado no tratamento biológico de águas residuais (Eckenfelder *et al.*, 1986; Grady e Lim, 1980; Gray, 2004; Metcalf e Eddy, 2003).

O tratamento através de lamas activadas é um processo biológico onde compostos orgânicos solúveis são convertidos em dióxido de carbono, água e células bacterianas. A principal função deste processo é de remoção de matéria orgânica degradável, com vista à produção de um efluente que contenha baixas concentrações de matéria orgânica e sólidos suspensos. A remoção da matéria orgânica ocorre por oxidação biológica e adsorção física (Eckenfelder *et al.*, 1986).

As lamas activadas dizem assim respeito à biomassa microbiana dentro do reactor que é compreendida principalmente por bactérias e outra microfauna e flora. A lama consiste numa suspensão floculenta destes organismos e é muitas vezes conhecida por licor misto.

O processo é compreendido por duas fases distintas, a de conversão biológica que ocorre no tanque de arejamento e a de sedimentação que ocorre no decantador secundário (Grady e Lim, 1980).

Na primeira fase, a água residual é adicionada ao tanque de arejamento que contém a população microbiana mista, e é também adicionado ar ou por agitação de superfície ou por difusores que utilizam ar comprimido. O tanque de arejamento fornece um ambiente onde as bactérias *floc-forming* (bactérias formadoras de flocos) crescem e são continuamente misturadas com a matéria orgânica na presença de oxigénio. Este órgão para além de fornecer oxigénio aos microrganismos aeróbios, tem também a função de manutenção dos flocos num estado contínuo de suspensão agitada, garantindo o contacto máximo entre a superfície dos flocos e a água residual. A acção de mistura contínua é importante, não apenas para garantir alimento adequado, mas também um gradiente de concentração de oxigénio máximo para aumentar a transferência de massa e para ajudar a dispersão metabólica dos produtos finais dentro do floco. O arejamento e mistura das lamas activadas e da água residual é essencial. O arejamento tem como objectivo a transferência de oxigénio, enquanto que a mistura apenas tem como objectivo envolver a biomassa microbiana na água residual afluyente. A mistura e arejamento podem ser realizados independentemente, mas são normalmente realizados por um único equipamento mecânico, que podem ser por exemplo arejadores de superfície ou difusores.

Depois de passar pelo tanque de arejamento, o fluxo é dirigido para um decantador secundário, que pode ser considerado o órgão crítico do processo de lamas activadas, e onde a suspensão microbiana é sedimentada, decantada e espessada, sendo desta forma separada do efluente tratado, isto é de um clarificado (Eckenfelder *et al.*, 1986; Metcalf e Eddy, 2003).

Parte desta biomassa é depois recirculada para o tanque de arejamento para manter uma densidade microbiana elevada, com vista a continuar a biodegradação da matéria orgânica

afluente e atingir-se a máxima eliminação microbiana possível da água residual. Esta recirculação permite que haja uma contínua inoculação com microrganismos, garantindo a presença de uma população microbiana adequada para oxidar completamente a água residual durante o período de retenção dentro do tanque de arejamento. A outra parte da biomassa que não é recirculada é removida periodicamente através da purga à medida que o processo produz excesso de lama e de modo a manter uma idade de lamas desejada, requerendo um tratamento específico desta previamente à sua eliminação (Eckenfelder *et al.*, 1986; Grady e Lim, 1980; Metcalf e Eddy, 2003).

Uma boa operação do decantador secundário é essencial para a operação de um sistema de lamas activadas eficientemente. O nível de sólidos num tanque de arejamento de lamas activadas é influenciado por três factores que são:

- a concentração de sólidos suspensos afluente;
- a quantidade de microrganismos produzida pela oxidação da matéria orgânica;
- a quantidade de lama recirculada do decantador secundário para o tanque de arejamento (Eckenfelder *et al.*, 1986).

A característica mais importante no processo de lamas activadas é a natureza floculenta da biomassa microbiana. Os flocos não têm apenas de ser eficientes na adsorção e posterior absorção da fracção orgânica da água residual, mas também têm de se separar rápida e efectivamente do efluente tratado dentro do decantador. Qualquer alteração na operação do reactor irá levar a alterações na natureza dos flocos, que podem afectar adversamente todo o processo de variadas formas, mas verifica-se mais frequentemente uma má sedimentação resultando em efluentes turvos e numa perda de biomassa (Gray, 2004; Metcalf e Eddy, 2003).

Com oxigénio e alimento ilimitado, taxas extremamente elevadas de crescimento e respiração microbiana podem ser atingidas, resultando na utilização da matéria orgânica presente tanto para oxidação em produtos finais, como CO_2 , NO_3 , SO_4 e PO_4 (mineralização) e para conversão em novo material celular (assimilação).

O mecanismo de remoção, assimilação ou mineralização, pode ser seleccionado pela utilização de condições específicas de operação com certas vantagens e desvantagens. O processo mais rápido de remoção de nutrientes é conseguido por remoção da matéria orgânica apenas por assimilação, onde é precipitado na forma de biomassa. Este processo produz uma quantidade considerável de lamas em excesso, que requerem uma maior proporção de custos de operação a gastar na separação e eliminação das lamas. A oxidação completa (mineralização) da água residual é mais lenta e requer longos períodos

de arejamento. Portanto, apesar de ser produzida menor quantidade de lamas, os custos de manuseamento das lamas e arejamento serão maiores (Gray, 2004).

Na figura 2.2 mostra-se o esquema de funcionamento das lamas activadas.

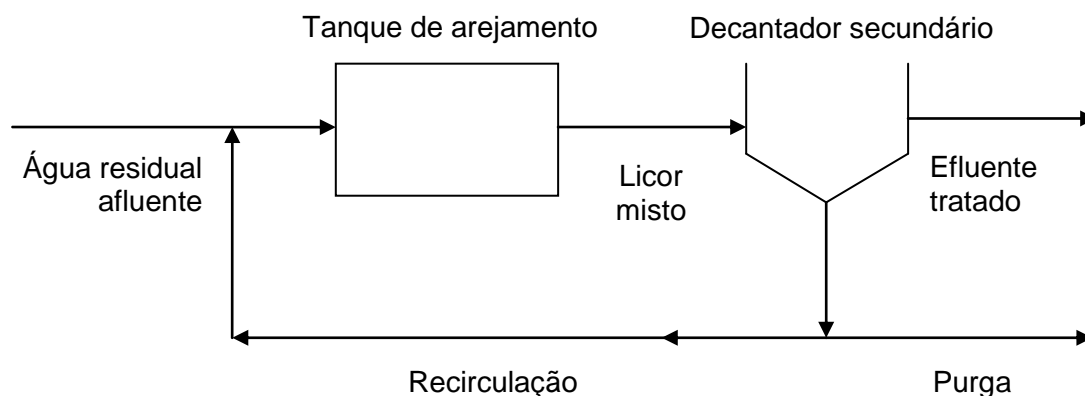


Figura 2.2 – Esquema das lamas activadas (Fonte: Adaptado de Santos Oliveira, 1982)

2.2. Controlo de uma ETAR de lamas activadas

2.2.1. Monitorização de uma ETAR

Numa instalação de tratamento de águas residuais com sistema de tratamento biológico, é necessário um controlo e operação efectivos. Este controlo requer uma monitorização do desempenho do sistema, para posterior utilização desta informação no controlo do processo. A monitorização do desempenho consiste na aquisição de informação relacionada com o processo de operação. O objectivo da monitorização do desempenho do sistema será portanto:

- avaliar as eficiências do sistema e das unidades de operação;
- garantir um desempenho óptimo da instalação de tratamento através de um controlo de processo;
- assegurar às agências reguladoras que a instalação de tratamento de águas residuais está em conformidade com os requisitos de qualidade do efluente permitidos para descarga.

A monitorização do desempenho do sistema pode ser de dois tipos diferentes, monitorização operacional e monitorização analítica.

A monitorização operacional é principalmente da responsabilidade do operador da instalação de tratamento. As suas responsabilidades são o registo do comportamento dos instrumentos, avaliação de dados analíticos, inspecção dos vários componentes dos sistemas mecânicos e eléctricos, garantir uma operação própria dos sensores dos instrumentos e observar as características físicas dos fluxos de águas e tanques de reacção (por exemplo testes rápidos de sedimentabilidade das lamas, detecção do nível da camada de lama, presença de espumas, cor dos conteúdos do tanque de arejamento, etc). O pessoal responsável pela operação de uma instalação de tratamento de águas residuais deve ser bem treinado nos princípios e práticas de tratamento de águas residuais. O treino dos operadores na manutenção e inspecção dos equipamentos e instrumentos é importante para uma monitorização efectiva.

Por outro lado, a monitorização analítica que pode ser da responsabilidade do operador ou do químico analista, baseia-se na recolha de informação, elaboração de testes analíticos às amostras, manutenção do equipamento e material de laboratório e registo de dados analíticos. Para obter a informação necessária à elaboração de testes deste tipo devem ser cumpridos os seguintes pré-requisitos:

- A localização dos pontos de amostragem é de grande importância. As amostras devem ser colhidas em pontos que reflectam precisamente o desempenho do tratamento;
- As técnicas de amostragem devem ser cuidadosamente consideradas, de forma a serem representativas para a análise que se pretende realizar;
- A preservação da amostra é importante na obtenção de resultados precisos, especialmente nos casos em que as amostras têm de ser armazenadas por períodos de tempo extensos entre a amostragem e a análise;
- É essencial que o pessoal operador seja treinado de forma a produzir dados de monitorização significativos. Muitas vezes a qualidade dos dados analíticos está directamente relacionada com a experiência e treino do pessoal;
- Devem ser elaborados programas de controlo da qualidade analítica para dar garantia da qualidade dos dados e detectar deficiências no programa analítico. Devem ser feitas normalizações para cada análise, ensaios em branco e ocasionalmente comparadas com os resultados de laboratórios exteriores;
- A selecção do método analítico é essencial para adquirir os dados mais precisos ao menor custo. Algumas das considerações utilizadas na escolha do método analítico são: 1) a capacidade do pessoal analítico para desempenhar um método particular; 2) o custo do equipamento e dos reagentes; 3) o tempo e disponibilidade de pessoal requerido para a

análise; 4) a disponibilidade do pessoal especializado para reparar e calibrar os instrumentos;

– A frequência das análises depende do número mínimo de análises que permite fornecer informação adequada das condições das várias unidades e operações do sistema. Esta depende também da variabilidade da qualidade da água residual e dos parâmetros específicos de operação das várias unidades (Eckenfelder *et al.*, 1986).

Segundo, Oliveira (2008), existem dois tipos de análises que se podem realizar:

– análises de controlo de processo que podem ser efectuadas em qualquer laboratório e dizem respeito às análises utilizadas para controlo de processo;

– análises para verificação do cumprimento legal que têm de ser efectuadas obrigatoriamente em laboratório acreditado e dizem respeito às análises utilizadas para verificação da conformidade de todos os requisitos legislativos e normativos em vigor (Oliveira, 2008).

2.2.2. Parâmetros de controlo do processo

A composição e características de uma água residual afluenta a uma ETAR, variam ao longo do tempo. Estas variações na qualidade da água residual irão influenciar os processos de tratamento. De forma a controlar o processo de operação de uma ETAR são utilizados vários parâmetros que poderão ser manipulados e ajustados de acordo com as necessidades do momento.

2.2.2.1. Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

A concentração de sólidos suspensos totais (SST) do tanque de arejamento é uma medida aproximada da biomassa presente neste órgão. Este parâmetro básico é utilizado no cálculo de vários outros parâmetros de operação, e é normalmente expresso em mg/L ou g/cm³. Os SST devem ser medidos diariamente e a sua concentração normal no licor misto está aproximadamente entre 2 000 e 5 000 mg/L (Eckenfelder *et al.*, 1986; Gray, 2004).

Visto que parte destes sólidos fazem parte da fracção inorgânica, e em alguns casos esta proporção é significativa, pode ser necessário nalguns casos estimar apenas a fracção orgânica dos sólidos suspensos. Sendo assim, determina-se a matéria combustível presente nos sólidos suspensos do licor misto, através da queima das lamas secas numa mufla a

500°C. Os sólidos suspensos orgânicos são denominados de sólidos suspensos voláteis (SSV) (Gray, 2004).

No entanto, os SSV não dão indicação da matéria bioquimicamente activa, visto que os SSV podem ser constituídos por microrganismos activos e sólidos voláteis inertes. Para determinar apenas os microrganismos activos dos sólidos suspensos voláteis terá de ser empregue uma técnica mais complexa, que poderá passar pela determinação da taxa de absorção de oxigénio, ATP, conteúdo da enzima desidrogenase (NADH), contagem em placas ou fracção degradável. A proporção destes microrganismos irá depender das condições de operação das lamas activadas, assim como a quantidade de sólidos voláteis da água residual. Por este motivo, os SSV não deverão ser utilizados como uma medida exacta da actividade microbiana (Eckenfelder *et al.*, 1986; Jin *et al.*, 2003).

2.2.2.2. Sedimentabilidade das lamas

As características de sedimentação e compactação das lamas activadas são requisitos primários para a operação de um sistema deste tipo com sucesso. Portanto, métodos rápidos de avaliação da sedimentabilidade e compactação são vitais para manter uma boa separação da lama no decantador secundário, garantindo uma recirculação adequada e um efluente final com baixa concentração de sólidos suspensos. Para avaliar esta característica das lamas podem ser utilizados vários índices (Eckenfelder *et al.*, 1986; Gray, 2004).

2.2.2.2.1. Índice de Volume de Lamas (SVI) e Índice de Densidade de Lamas (SDI)

A capacidade de sedimentação e compactação das lamas activadas é crucial para o desempenho e eficiência globais do processo de tratamento. O Índice de Volume de Lamas (SVI – “Sludge Volume Index”) e o Índice de Densidade de Lamas (SDI – “Sludge Density Index”) são índices de medição da capacidade de sedimentação das lamas activadas. Para se obterem estes índices, faz-se com que uma amostra de licor misto proveniente do tanque de arejamento de lamas activadas sedimente em determinadas condições padronizadas. O SVI é medido enchendo um cilindro graduado de 1 litro com a amostra e permitindo que este permaneça sem distúrbios durante 30 minutos. O volume de lama sedimentada é depois lido em mililitros. Em paralelo deve determinar-se a concentração de SST da amostra. O SVI é então exprimido como o volume em mililitros (mL) ocupado por um grama de sólidos suspensos totais, tal como indicado na equação (Gray, 2004; Jin *et al.*, 2003):

$$SVI = \frac{\text{Volume de lamas após 30 minutos de sedimentação (mL/L)}}{\text{Concentração de SST (g/L)}} \quad (\text{mL/g})$$

Por outro lado, o SDI é dado por:

$$SDI = \frac{100}{SVI} \quad (\text{mL/g})$$

Um SVI elevado indica uma fraca capacidade de compressibilidade e decantabilidade das lamas. Em geral uma lama com um $SVI > 120 \text{ mL/g}$ tem uma fraca capacidade de compressibilidade e decantabilidade, e uma boa lama terá um $SVI < 80 \text{ mL/g}$. Estes índices são rápidos e fáceis de se obter no local e são rotineiramente utilizados pelos operadores para avaliar as condições das lamas activadas, não sendo no entanto utilizados para projecto (Gray, 2004; Jin *et al.*, 2003).

2.2.2.2.2. “Stirred Specific Volume Index” (SSVI)

Segundo Gray (2004), uma medida mais exacta de sedimentabilidade, que é utilizada em estudos e projectos é o SSVI – “Stirred Specific Volume Index” que é determinado a partir de um ensaio de decantação retardada. Este índice é medido numa coluna de sedimentação especial com 0,5 m de profundidade, 0,1 m de diâmetro e com uma haste de aço rodando com uma velocidade de uma rotação por minuto. Este teste reproduz a situação não ideal em decantadores, enquanto que o SVI é medido sob condições de repouso completo. A utilização do teste de SSVI tem-se tornado mais utilizado para gestão operacional normal, desde que o SVI mostrou ter algumas limitações. Por exemplo, alterações marcadas na sedimentabilidade que têm sido reflectidas pelo SSVI não têm sido detectadas pelo SVI, e este último pode variar de uma forma inconsistente com a concentração inicial de sólidos suspensos. De acordo com Gray (2004), um estudo de Rachwal *et al.* demonstrou também que o SVI tem um intervalo de trabalho mais limitado do que o SSVI devido à independência do SSVI na concentração de sólidos (Gray, 2004; Santos, 2009).

2.2.2.2.3. “Diluted Sludge Volume Index” (DSVI)

Segundo o mesmo autor, Gray (2004), outro índice o DSVI – “Diluted Sludge Volume Index”, é também cada vez mais utilizado em lugar do comum SVI uma vez que supera os problemas com as lamas que têm uma elevada concentração de SST. Vários cilindros graduados de 1 litro são necessários para a determinação deste índice. Em cada um dos

cilindros são colocados diferentes volumes de licor misto e adiciona-se água até perfazer o volume total, permitindo assim obter diferentes diluições. Os volumes de licor misto utilizados são: 1000 mL no primeiro cilindro, 500 mL no segundo, 250 mL no terceiro, e assim sucessivamente, completando o restante volume com água nos cilindros em que é necessário. O licor misto dentro do cilindro é completamente misturado durante um período de tempo de 30 a 60 segundos e após este tempo, permite-se que decante por um período de tempo de 30 minutos. Tal como no SVI, após os 30 minutos, o volume de lamas é medido em mililitros. O DSVI é calculado a partir da seguinte equação utilizando a diluição que corresponde ao volume menor de lama sedimentada, mas inferior a 200 mL:

$$DSVI = \frac{V \text{ (mL/L)} \times 2^n}{SST \text{ (g/L)}} \text{ (mL/g)}$$

onde n corresponde ao número de diluições efectuadas e V ao volume de lama sedimentada. A concentração de sólidos suspensos totais é determinada à amostra não diluída. Os valores obtidos são interpretados da mesma forma do que o SVI (Gray, 2004).

2.2.2.2.4. Velocidade de sedimentação (ZSV)

A velocidade de sedimentação das lamas (ZSV – “Zone Settling Velocity”) é um parâmetro chave para avaliar as propriedades de sedimentação das lamas. Segundo os autores Eckenfelder *et al.* (1986) e Jin *et al.* (2003), a compressibilidade das lamas activadas é avaliada pelo SVI, enquanto que a sedimentabilidade das mesmas é avaliada pelo ZSV. Segundo o mesmo autor (Jin *et al.* (2003)), é evidente que existe uma correlação entre estas duas medidas, visto que uma fraca sedimentação está associada a uma fraca compactação, no entanto esta correlação não é consistente, já que estas são afectadas por diferentes características das lamas (Eckenfelder *et al.*, 1986; Jin *et al.*, 2003).

Sabe-se que tanto o SVI como ZSV, são influenciados pela geometria do decantador, pela concentração de SST, pelo volume de lamas, pela temperatura, assim como pela estrutura do floco. Porém, o ZSV é essencialmente afectado pela morfologia e densidade do floco.

Segundo Eckenfelder *et al.* (1986), o ZSV está relacionado com a razão F/M, uma vez que a velocidade de sedimentação estará no seu máximo no intervalo óptimo da razão F/M. Um decréscimo do valor de ZSV pode indicar uma redução da separação sólido-líquido no decantador secundário, devido a vários possíveis problemas (Eckenfelder *et al.*, 1986).

Propriedades de superfície como a hidrofobicidade e a carga, estão significativamente ligadas ao SVI e ao ZSV. Superfícies de flocos altamente hidrofóbicas ou negativamente

carregadas estão associadas a compressibilidade e sedimentabilidade das lamas relativamente fracas. A presença de cargas de superfície negativas, na superfície do floco pode criar interações electrostáticas repulsivas que evitam que haja um contacto próximo. Um elevado valor de cargas negativas de superfície indicam que deve haver mais cargas negativas livres e menos ligações electrostáticas com cationes na superfície dos flocos. Por outro lado, a qualidade dos filamentos se os houver, assim como a estrutura do núcleo dos flocos influenciam a viscosidade da lama (Jin *et al.*, 2003).

2.2.2.3. Idade de Lamas (IL)

A idade de lamas (IL) diz respeito ao tempo de permanência das lamas dentro do sistema de tratamento. Este parâmetro afecta as características e condições dos flocos de lamas activadas dentro do tanque de arejamento. O IL é calculado pela quantidade total de lamas do sistema a dividir pela taxa de purga de lamas do sistema (Santos Oliveira, 1982).

O IL é um factor operacional que permite controlar o excesso de actividade das lamas, já que este parâmetro é recíproco da taxa de crescimento específica das lamas e portanto pode ser considerado como uma medida da actividade das lamas. Uma reduzida idade de lamas, <0,5 dia, está relacionada com uma elevada taxa de crescimento das lamas, sendo estas utilizadas em regimes de alta carga. Pelo contrário, uma elevada idade de lamas, > 5 dias, está relacionada com uma reduzida taxa de crescimento por parte das lamas, sendo estas utilizadas em sistemas de arejamento prolongado (regimes de baixa carga).

Uma instalação de lamas activadas convencional tem uma idade de lamas entre 4 a 7 dias, e normalmente boas capacidades de sedimentabilidade. No entanto, para idades de lamas acima de 8 dias, ou entre 0,5 a 3 dias, verifica-se uma redução no desempenho da sedimentabilidade (Gray, 2004).

Quando se aumenta a quantidade de lama purgada, o nível da camada de lama dentro do decantador secundário é reduzido. No entanto, se não se purgar, mantém-se um nível de camada de lama elevado, começando a haver espessamento da lama. Deve ser tida especial atenção a este aspecto, uma vez que as lamas não estão estabilizadas, continuando em actividade. Portanto, se se permitir que as lamas permaneçam no decantador por longos períodos de tempo, começará a haver libertação de gases que poderá causar flotação da lama (processo inverso à sedimentação, em que as lamas ascendem ao cimo do decantador). Este processo provoca uma deterioração da qualidade do efluente final (Eckenfelder *et al.*, 1986).

2.2.2.4. Tempo de retenção hidráulico (TRH)

O tempo de retenção hidráulico (TRH) dentro do tanque de arejamento é exprimido em horas, e é calculado através da seguinte expressão:

$$TRH = \frac{V \text{ (m}^3\text{)}}{Q \text{ (m}^3\text{/h)}} \text{ (h)}$$

onde V corresponde à capacidade do tanque de arejamento e Q ao caudal de água residual afluyente (Eckenfelder *et al.*, 1986; Gray, 2004).

O TRH é um parâmetro muito importante visto que este deve ser suficientemente elevado para permitir que os processos de adsorção, floculação e mineralização ocorram (Gray, 2004).

2.2.2.5. Carga orgânica volúmica

As águas residuais têm diferentes conteúdos orgânicos, sendo portanto útil exprimir a carga orgânica em termos de CBO₅, por capacidade do tanque de arejamento, e por dia, da seguinte forma:

$$\text{Carga orgânica} = \frac{Q \text{ (m}^3\text{/dia)} \times \text{CBO}_5 \text{ (kg/m}^3\text{)}}{V \text{ (m}^3\text{)}} \text{ (kg CBO}_5\text{/m}^3\text{.dia)}$$

onde Q corresponde ao caudal de água residual afluyente, CBO₅ à carência bioquímica de oxigénio de 5 dias afluyente ao tanque de arejamento, e V à capacidade do tanque de arejamento (Gray, 2004).

2.2.2.6. Factor de Carga Mássica ou razão F/M

A carga mássica refere-se à razão de alimento / microrganismos, que em inglês se utiliza “Food (F) to Microorganism (M) ratio”, ou seja razão F/M. Para determinar esta razão, utiliza-se a seguinte expressão:

$$\frac{F}{M} = \frac{Q \text{ (m}^3\text{/dia)} \times \text{CBO}_5 \text{ (Kg/m}^3\text{)}}{V \text{ (m}^3\text{)} \times [\text{SSV}] \text{ (kg/m}^3\text{)}} \text{ (kg CBO}_5\text{/kg SSV.dia)}$$

onde Q corresponde ao caudal de água residual afluyente, CBO_5 à carência bioquímica de oxigénio de 5 dias afluyente ao tanque de arejamento, V à capacidade do tanque de arejamento, e $[SSV]$ à concentração de SSV no tanque de arejamento (Metcalf e Eddy, 2003).

Quando há excesso de alimento, a taxa de metabolismo dos microrganismos é máxima, e a razão F/M elevada, estando os microrganismos em fase de crescimento exponencial. Nestas situações atingem-se elevadas remoções de CBO_5 . No entanto, nestas condições os microrganismos não formam flocos, estando dispersos no licor misto, tornando-o difícil de sedimentar e formar uma lama para recirculação. Para além disso, como existe alimento em excesso, nem toda a matéria orgânica será oxidada, permanecendo uma parte no efluente final (Gray, 2004).

Pelo contrário, quando as razões F/M são reduzidas, os microrganismos estão em condições de limitação de alimento, decrescendo rapidamente a taxa de metabolismo, até que os microrganismos entram em fase de respiração endógena. Mas, nesta situação a oxidação da matéria orgânica é quase completa, resultando numa elevada qualidade do efluente final, com os microrganismos a flocularem bem e sedimentarem rapidamente (Gray, 2004). No entanto, segundo Eckenfelder *et al.* (1986), baixas razões F/M podem resultar em grandes quantidades de microrganismos dispersos e fracas condições de sedimentabilidade das lamas, que originam consequentemente aumento dos sólidos suspensos no efluente final.

Na figura 2.3 apresenta-se um gráfico com a relação entre a taxa de metabolismo e a razão F/M .

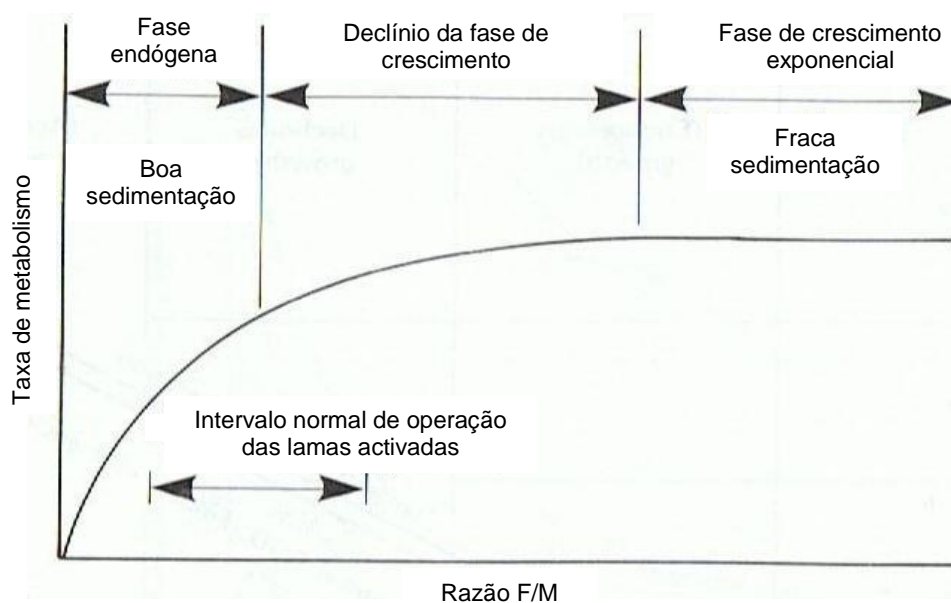


Figura 2.3 – Relação entre a razão F/M e a taxa de metabolismo (Fonte: Adaptado de Gray, 2004)

2.2.2.7. Recirculação das lamas

As lamas activadas são recirculadas para o tanque de arejamento com vista a manter uma biomassa microbiana suficiente para oxidar os compostos presentes nas águas residuais, de forma também a atingir-se uma razão F/M desejada, otimizar a sedimentabilidade e o processo de tratamento. A razão de recirculação, Q_r/Q , é expressa em percentagem do caudal de água residual afluyente (Q_r – caudal de recirculação e Q – caudal de água residual afluyente) (Gray, 2004).

Este parâmetro é aquele que pode ser mais controlado pelo operador da instalação. A quantidade de lama a recircular pode ser calculada, seleccionando a concentração de sólidos pretendida e com recurso a balanços de massa, que por sua vez irá influenciar a razão F/M (Eckenfelder *et al.*, 1986).

Os sistemas de lamas activadas podem ser operados em diferentes regimes, alta, média ou baixa carga, de acordo com uma combinação dos parâmetros anteriormente referidos. Nas tabelas 2.1 e 2.2, encontram-se as combinações de valores dos parâmetros de controlo de processo para cada tipo de regime.

Tabela 2.1 – Parâmetros de controlo do processo de tratamento para cada tipo de regime de funcionamento em sistemas de lamas activadas (Fonte: Adaptado de Gray, 2004)

Regimes de tratamento	Tempo de retenção hidráulico (h)	Carga orgânica volúmica (kg CBO ₅ /m ³ .dia)	Razão F/M (kg CBO ₅ /kg SST.dia)
Alta carga	1 - 2	> 2,5	> 1,0
Média carga	5 - 14	0,4 - 1,2	0,2 - 0,5
Baixa carga	24 - 72	< 0,3	0,1

Tabela 2.2 – (continuação) Parâmetros de controlo do processo de tratamento para cada tipo de regime de funcionamento em sistemas de lamas activadas (Fonte: Adaptado de Gray, 2004)

Regimes de tratamento	Idade de Lamas (d)	Produção de lama (kg de lama seca por kg de CBO ₅ removido)
Alta carga	0,2 - 0,5	0,8 - 1,0
Média carga	3 - 4	0,5 - 0,8
Baixa carga	> 5 - 6	0,4

2.2.3. Outros factores que afectam o processo

2.2.3.1. Necessidades de nutrientes

Os organismos aeróbios para além de oxigénio necessitam de nutrientes, como azoto, fósforo e outros oligoelementos para uma actividade óptima. Os oligoelementos estão normalmente presentes em quantidades suficientes na água residual afluyente. No entanto, nas águas residuais domésticas o azoto e o fósforo estão normalmente em excesso, podendo ter de ser incluídos processos de tratamento que conduzam a uma redução destes.

Estes dois nutrientes são utilizados pelas bactérias para síntese de novas células. A proporção adequada destes nutrientes para um bom funcionamento do sistema e um bom desempenho dos microrganismos será por cada 100 grama de CBO₅ removido, 5 grama de azoto e 1 grama de fósforo e é normalmente esquematizada pela razão 100:5:1 (CBO:N:P).

Por outro lado, se estes nutrientes não estiverem presentes em quantidades suficientes, pode desencadear-se o crescimento de organismos filamentosos, flocos dispersos e/ ou limitar a remoção de CBO, causando um aumento de sólidos no efluente final e uma redução da eficiência de remoção de CBO (Eckenfelder *et al.*, 1986).

2.2.3.2. Temperatura

A temperatura pode ter vários efeitos no desempenho do processo de lamas activadas, incluindo na sedimentabilidade e na taxa de actividade biológica. De forma geral, um aumento da temperatura do sistema traduz-se num aumento da actividade biológica (Eckenfelder *et al.*, 1986).

2.2.3.3. pH

Para os microrganismos de um sistema de lamas activadas actuarem eficientemente necessitam normalmente de um pH entre 6,5 a 8,5. Quando o pH está fora deste intervalo, o processo é afectado, devendo ser por isso corrigido. No entanto, a correcção deve ser feita gradualmente e não de uma só vez, para evitar choques de pH, uma vez que este efeito poderá provocar mais danos na actividade microbiana. Este parâmetro deve ser monitorizado no tanque de arejamento, continuamente se possível (Eckenfelder *et al.*, 1986).

2.2.3.4. Oxigénio dissolvido (OD)

Os microrganismos num sistema de lamas activadas utilizam oxigénio para converter a matéria orgânica presente na água residual em dióxido de carbono, água e novas células. Os subprodutos originados desta degradação aeróbia da matéria orgânica são compostos estáveis. Num sistema deste tipo, é obrigatório que seja mantido um nível mínimo de oxigénio dissolvido para redução dos constituintes orgânicos da água residual.

O nível de OD necessário para manter condições aeróbias completas no floco biológico, depende da taxa de absorção de oxigénio, que por sua vez depende da razão F/M ou da idade de lamas do processo. Para além disso, uma alteração na intensidade da mistura, irá influenciar directamente a concentração de oxigénio dissolvido na água. A manutenção de uma concentração de oxigénio dissolvido adequada é importante para manutenção de uma boa qualidade da lama. Este parâmetro deve ser medido no local, no tanque de arejamento, continuamente se possível, ou no mínimo uma vez em cada oito horas. Se os níveis de OD descerem abaixo do desejável, deve aumentar-se a potência dos equipamentos de arejamento (Eckenfelder *et al.*, 1986; Schryver *et al.*, 2008).

2.2.3.5. Mistura e arejamento

Uma mistura suficiente do licor misto no tanque de arejamento é necessária para manter um contacto íntimo entre os microrganismos, os resíduos orgânicos e o oxigénio. No entanto, um excesso de mistura pode causar quebra dos flocos e desperdício de energia. Por outro lado, um défice de mistura e arejamento pode resultar numa utilização ineficiente do tanque e incapacidade de transferência de oxigénio. Quando a mistura não é suficiente, permite-se aos microrganismos que sedimentem e promove-se a actividade anaeróbia. Por fim, a actividade anaeróbia pode causar tanto um aumento futuro das necessidades de oxigénio ou fracas condições de sedimentabilidade das lamas (Eckenfelder *et al.*, 1986).

A utilização de uma certa potência num dispositivo de arejamento, irá impor uma determinada intensidade de mistura, que irá por sua vez determinar o estado estacionário do tamanho dos flocos, isto é o equilíbrio entre a taxa de agregação e a taxa de quebra dos flocos, assim como a distribuição do tamanho do floco (Schryver *et al.*, 2008; Chaignon *et al.*, 2002).

Segundo um estudo de Chaignon *et al.* (2002), a alternância entre condições de agitação de elevados e reduzidos níveis de intensidade, revelaram que o processo de fragmentação e re-agregação dos flocos de lamas activadas é largamente reversível à escala macroscópica. No entanto, quando a agregação ocorre através de pontes entre partículas e espécies

poliméricas flocculantes, os flocos mostravam voltar a formar-se apenas parcialmente após um período de agitação. Quebras das ligações entre partículas e espécies flocculantes durante um processo de fragmentação e/ou reestruturação dos flocos leva à formação de estruturas mais compactas. Talvez porque é improvável que os flocos se voltem a formar exactamente com o mesmo material, havendo assim uma troca dos constituintes do flocos (Chaignon *et al.*, 2002).

2.3. Organismos formadores de flocos

2.3.1. Biofloculação

“A unidade operacional básica de um sistema de lamas activadas é o flocos” (Gray, 2004). Ao observar-se ao microscópio as lamas activadas é possível ver que estas são constituídas por aglomerações de microrganismos, a que se dá o nome de flocos. Quando a lama e a água residual são misturadas, há uma rápida aglomeração da matéria suspensa e coloidal em flocos, que irá provocar uma queda da CBO da água residual. O crescimento de bons flocos é importante para uma operação bem sucedida, de forma a que a matéria suspensa, coloidal ou iónica presente na água residual possa ser removida por adsorção e aglomeração. Posteriormente, se os flocos tiverem sido bem formados a separação da biomassa do efluente tratado será rápida e eficiente (Grady e Lim, 1980; Gray, 2004).

Alguns estudos indicaram que muitos sistemas de lamas activadas passaram por vários problemas de separação da biomassa em decantadores. Existem dois principais tipos de problemas de sedimentação: (i) lama com “bulking” ou “foaming” devido à proliferação de bactérias filamentosas e (ii) lama com fracas propriedades de floculação, por exemplo por formação de flocos pequenos e leves. Estes problemas baseiam-se em variações consideráveis das características dos flocos que podem causar dificuldades operacionais no sistema, e que são provocados por exemplo por descargas tóxicas, desequilíbrios nutricionais, ou alterações na ecologia microbiana. Estas variações podem induzir alterações na superfície química dos flocos, que por sua vez irão influenciar as características de sedimentação das lamas activadas. Ambos os problemas são importantes, mas as fracas propriedades de floculação das lamas, têm sido menos investigadas. Visto que na maioria dos casos são desejáveis flocos grandes, densos e fortes para uma boa sedimentação e compactação das lamas activadas, este assunto é bastante importante. Nas figuras 2.4 (a) e (b) mostram-se exemplos típicos de flocos (Gray, 2004; Jin *et al.*, 2003).

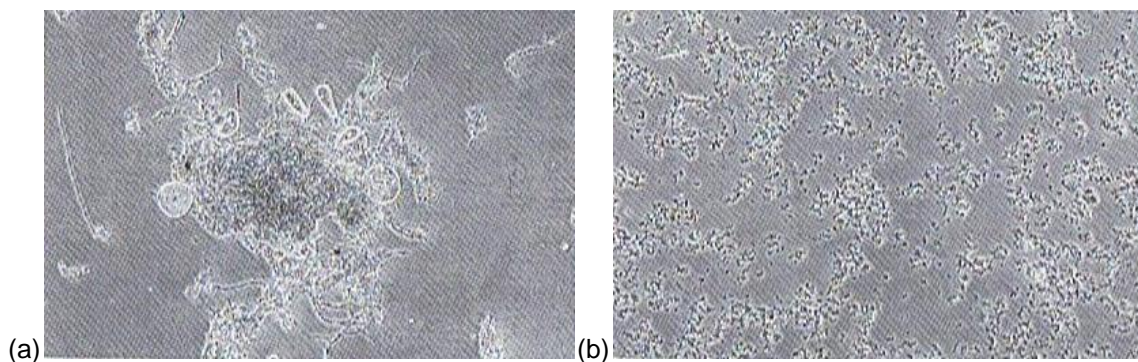


Figura 2.4 – Exemplo típico de flocos: (a) Floco maduro com colonização secundária típica de lamas activadas com boas características de sedimentação; (b) Flocos pequenos dispersos típicos de lamas activadas com fracas características de sedimentação (Fonte: Gray, 2004)

O processo de biofloculação ainda não é completamente compreendido. Inicialmente pensava-se que este processo ocorria devido à bactéria *slime-forming Zoogloea ramigera*, mas hoje sabe-se que muitas outras bactérias e protozoários estão envolvidos na formação dos flocos. Quando os flocos colidem uns com os outros, pode haver ou não ligação entre estes. Diferentes flocos de lama têm diferentes capacidades de flocular, dependendo das suas distintas propriedades físico-químicas. O que causa esta diferença na floculação não é completamente conhecido. Diversas bactérias, protozoários e detritos estão fixos à superfície do floco ou incorporados num material formando uma matriz. A composição deste material floculante também ainda não é totalmente conhecida, apesar de ser em grande parte de origem bacteriana. Segundo Gray (2004), vários estudos mostraram que este material é um polímero, que pode ser constituído por vários compostos orgânicos, como polissacarídeos, aminopolissacarídeos, proteínas e lípidos, mas a natureza exacta destes polímeros floculantes depende das espécies de bactérias ou protozoários que os produzem. As matrizes de polímeros extra celulares (ECP – “ExtraCellular Polymers”) ou substâncias de polímeros extra celulares (EPS – “Extracellular Polymeric Substances”), juntamente com os microrganismos responsáveis pela sua produção, são um sistema dinâmico que permite que as células dos flocos funcionem de uma maneira semelhante à dos organismos multicelulares. Acredita-se que estes compostos (EPS) são os principais constituintes da formação do floco e contribuem para uma melhor biofloculação, resultando em melhores propriedades de sedimentabilidade e desidratação, no entanto o seu papel exacto no controlo da capacidade destes processos (floculação, compressibilidade e sedimentabilidade da lama) é difícil de determinar, considerando a complexidade da matriz e a variabilidade de métodos de extracção existentes (Grady e Lim, 1980; Gray, 2004; Jin *et al.*, 2003; Schryver *et al.*, 2008; Chaignon *et al.*, 2002).

De uma forma geral, a biomassa num processo de lamas activadas é constituída, aproximadamente, por 95% de bactérias e 5% de outros microrganismos, dos quais fazem parte protozoários. Porém, nem todas as bactérias presentes são formadoras de flocos. As bactérias filamentosas também se desenvolvem no licor misto e têm um papel fundamental na formação de flocos com boa capacidade de sedimentação, uma vez que a compactação da estrutura do floco é favorecida pelo crescimento de um esqueleto filamentoso, no qual se acumulam substâncias inertes e outras bactérias. Os flocos que não possuem um esqueleto filamentoso, ou têm um crescimento filamentoso muito deficiente, são de menores dimensões, menos resistentes às agressões causadas pelo sistema de arejamento e têm menor capacidade de sedimentar. No entanto, os problemas surgem quando estas bactérias se tornam dominantes, causando os conhecidos problemas de *bulking* ou *foaming* (Lactema, 2010).

A floculação das lamas activadas depende de factores físicos (capacidade de floculação, viscosidade, hidrofobicidade, carga de superfície), químicos (constituintes dos polímeros e conteúdo em metais) e biológicos / morfológicos (distribuição do tamanho do floco, etc). As propriedades dos flocos como distribuição do tamanho e morfologia, podem diferir substancialmente como resultado de diferenças no ambiente da instalação de tratamento. Reconhece-se que a quantidade de EPS, propriedades da superfície (propriedades coloidais), distribuição do tamanho do floco, densidade e comprimento dos filamentos são os principais factores associados às características das lamas activadas (Jin *et al.*, 2003).

A capacidade de adsorção do floco depende da disponibilidade de superfícies celulares favoráveis a este processo. Quando todos os sítios de adsorção passam a estar ocupados, o floco tem uma reduzida capacidade de adsorção adicional, até que a matéria que já tenha sido adsorvida seja metabolizada. O processo de degradação e assimilação da matéria aglomerada, através da estabilização, processa-se lentamente. Sendo assim, o tempo de retenção hidráulico dentro do tanque de arejamento terá de ser suficiente para que o material adsorvido seja estabilizado, caso contrário irá haver uma redução progressiva da remoção de CBO (Gray, 2004).

Os flocos são unidades bioquímicas bastante complexas que podem ser constituídas por partículas primárias, agregados de partículas primárias, microflocos e flocos porosos, nos quais estão aglomerados vários milhões de bactérias heterotróficas juntamente com alguma matéria orgânica e inorgânica inerte. A percentagem de matéria orgânica presente nos flocos é dependente da razão F/M. Quanto maior o F/M maior a percentagem de matéria orgânica presente no floco, mas esta percentagem também depende da presença de decantação primária no processo de tratamento. No caso de as instalações não terem incorporado um tratamento primário, os flocos irão conter uma elevada proporção de matéria

inorgânica. Neste caso, a proporção de matéria orgânica poderá atingir cerca de 40 %, comparada com os cerca de 70 a 75% presentes em instalações que contenham tratamento primário.

As cargas de superfície das células microbianas e as pontes formadas por cátions polivalentes, influenciam a floculação. Cátions como o cálcio (Ca^{2+}) e o magnésio (Mg^{2+}), mas essencialmente o Ca^{2+} , têm um efeito positivo significativo nas propriedades de estrutura das lamas activadas, melhorando tanto as propriedades de sedimentação e compressibilidade, como de desidratação. Estas cargas presentes na superfície dos polímeros irão influenciar não só as características de sedimentação, mas também as propriedades de ligação à água (Grady e Lim, 1980; Gray, 2004; Jin *et al.*, 2003; Schryver *et al.*, 2008; Soda *et al.*, 1999).

Podem ocorrer trocas iónicas entre os flocos e os cátions da água residual. Neste caso, quando os cátions bivalentes são substituídos por cátions monovalentes, as ligações de polímero e as características da lama tornam-se fracas, que acontece por exemplo pela adição de sódio. Segundo Gray (2004), um estudo de Biggs *et al.* em que se utilizou uma técnica experimental que permitia medir o tamanho dos flocos durante a floculação, detectou-se que para concentrações de cálcio inferiores a 8 meq/L não havia um aumento significativo do tamanho dos flocos, enquanto que para concentrações acima desta se registou um aumento significativo no tamanho dos flocos. Por outro lado, segundo o mesmo autor, outro estudo de Cousin e Ganczarczyk revelou que como a densidade dos flocos aumenta com a adição de cátions polivalentes, há um decréscimo da porosidade do floco.

A elevada área específica de um floco não está apenas dependente do tamanho do floco, mas também da porosidade do mesmo, tal como se pode verificar através de microscopia electrónica onde se pode observar a aparência esponjosa dos flocos. Esta natureza esponjosa explica porque é que os flocos são bons na adsorção de matéria particulada, e também porque é que a taxa de difusão de nutrientes e oxigénio para o centro do floco é maior do que se os flocos fossem constituídos por uma massa homogénea de bactérias. No entanto, no centro do floco pode haver limitação tanto de alimento como de oxigénio.

Os flocos jovens contêm bactérias heterotróficas com crescimento e divisão activos, e uma elevada taxa de metabolismo. Por outro lado, os flocos mais velhos, têm uma baixa proporção de células viáveis, sendo compostos principalmente por células mortas e rodeados por uma camada bacteriana viável. Apesar de a maioria destas células não ser mais viável, elas retêm sistemas enzimáticos activos que têm uma reduzida taxa de metabolismo. No entanto, como estes flocos são fisicamente grandes, eles separam-se mais rapidamente do que os flocos jovens, que segundo Gray (2004) são muitas vezes erroneamente associados a más sedimentações. Uma lama bem floculada está num estado

de equilíbrio dinâmico entre os flocos (jovens e velhos), havendo constante agregação em grandes flocos e quebra para flocos de dimensões menores, devido ao stress imposto pelo sistema de arejamento. No entanto, quando os flocos têm fortes ligações de pontes, de cálcio, magnésio ou outros catiões multivalentes, eles podem tolerar pressões muito elevadas de rotura. O tamanho máximo atingido pelos flocos depende da sua força física e da influência da turbulência provocada pelo sistema de arejamento.

A morfologia dos flocos varia de forma característica entre instalações de lamas activadas conforme o regime de funcionamento utilizado, ou seja se estas funcionam em regime de alta ou baixa carga. No caso das instalações de baixa carga, os flocos são compactos com um núcleo central negro ou inclusões que são essencialmente compostas por matéria inorgânica como hidróxido de ferro, fosfato de cálcio e hidróxido de alumínio, visto que nestes regimes normalmente não existe decantação primária, juntamente com matéria orgânica não biodegradável. As partes mais leves, menos densas, e periféricas destes flocos são compostas por microrganismos activos. Isto ocorre devido a estes flocos serem mais velhos e terem sofrido repetidos períodos de crescimento activo e posteriormente períodos de fome, já que a idade das lamas é superior à dos outros regimes, resultando assim num floco compacto com matéria velha não biodegradada no centro, como mostra a figura 2.5. Pelo contrário, as instalações de alta carga muitas vezes formam crescimentos em forma de dedos, característicos das bactérias *Zoogloea*, nas quais cada bactéria individual está incorporada numa matriz transparente, como mostra a figura 2.6 (a) e (b). No entanto, a variabilidade de crescimento das bactérias em cada caso é muito grande, sendo por isso comum observarem-se crescimentos bacterianos de inclusões inertes e em forma de dedos em volta dos flocos muitas vezes juntos (Gray, 2004).

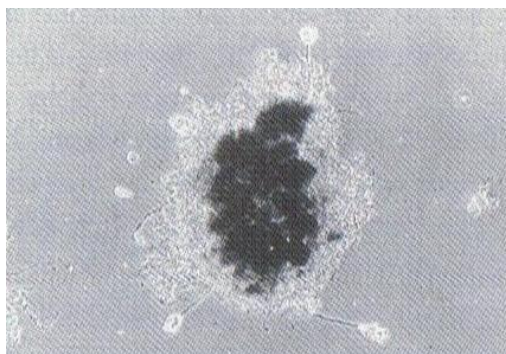


Figura 2.5 – Floco compacto com inclusões centrais negras (Fonte: Gray, 2004)

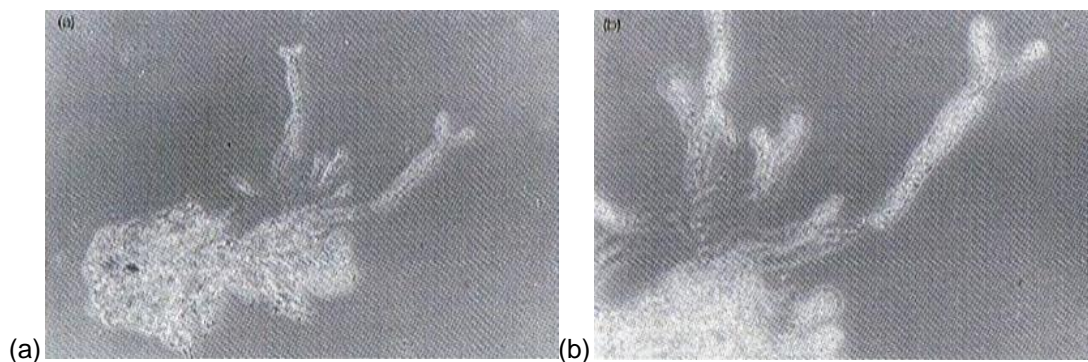


Figura 2.6 – Flocos com a bactéria *Zoogloea* tipicamente característica dos crescimentos em forma de dedos (a) ampliação 200x e (b) ampliação 400x (Fonte: Gray, 2004)

Normalmente os flocos são secundariamente colonizados por outros microrganismos como protozoários, nemátodes e rotíferos. Os protozoários ciliados são considerados particularmente importantes na medida em que se alimentam das bactérias dispersas, reduzindo deste modo a turvação do efluente final.

O processo de floculação depende da contínua re-inoculação com lama recirculada decantada, fazendo com que o sistema selecione por si os organismos *floc-forming* que se separam rapidamente no decantador. Deste modo, o processo é auto-regulado com os melhores flocos recirculados (Gray, 2004).

Os flocos separados através da sedimentação constituem a lama biológica. A importância prática da biofloculação é considerável, é ela que permite uma separação económica do efluente tratado e da biomassa sintetizada, através da sedimentação. A biofloculação é uma condição necessária para uma boa separação da biomassa por decantação, mas não é uma condição suficiente. Não apenas a dimensão das partículas desempenha um papel importante, mas também a sua massa específica deve ser considerada. O teor em água do floculado ligado à sua estrutura, desempenhará um papel essencial (Santos Oliveira, 1982).

2.3.2. Bactérias

O tratamento biológico converte biologicamente matéria coloidal e dissolvida não decantável, que necessita de ser removida antes de ser descarregada para um meio receptor, em matéria celular. Após a conversão desta matéria em células, estas podem ser separadas através do processo de sedimentação nos decantadores secundários. Os métodos de tratamento utilizados são em tudo semelhantes aos que ocorrem naturalmente em meios naturais. A remoção da matéria orgânica das águas residuais é realizada por organismos heterotróficos sendo estes predominantemente bactérias, cerca de 95%, mas

também outros organismos como fungos, protozoários, algas ou outros animais superiores (Gray, 2004; Lactema, 2010).

Os microrganismos removem a matéria orgânica do licor misto através dos processos de oxidação biológica e biossíntese. A oxidação biológica, diz respeito ao processo de respiração, na qual se formam produtos finais mineralizados que permanecem em solução e são descarregados juntamente com o efluente final, enquanto que a biossíntese converte matéria coloidal e solúvel em biomassa particulada, novas células, que são depois removidas por sedimentação. Para além disso, pode ocorrer também respiração endógena, na qual há auto-oxidação devido ao alimento se tornar limitante, obtendo-se assim energia apenas para manutenção. Todos estes processos podem estar a ocorrer simultaneamente num reactor e estequiometricamente são expressos como:

Oxidação biológica:

$$\text{COHNS (matéria orgânica)} + \text{O}_2 + \text{bactérias} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{outros produtos finais} + \text{energia}$$

Biossíntese:

$$\text{COHNS (matéria orgânica)} + \text{O}_2 + \text{bactérias} \rightarrow \text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2 \text{ (novas células)}$$

Auto-oxidação:

$$\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2 \text{ (bactérias)} + 5\text{O}_2 \rightarrow 5\text{CO}_2 + \text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{energia}$$

Nas águas residuais naturais, a matéria orgânica solúvel é principalmente removida por oxidação e biossíntese, mas nos ecossistemas microbianos intensivos utilizados em instalações de tratamento biológico, a adsorção é talvez o principal mecanismo de remoção. As propriedades de adsorção por parte dos microrganismos, são extremamente interessantes porque para além de conseguirem remover a matéria orgânica, também são capazes de remover poluentes não biodegradáveis, tais como orgânicos sintéticos, sais metálicos e substâncias radioactivas (Gray, 2004).

Entre as múltiplas formas de bactérias existentes nas lamas activadas destacam-se algumas espécies dos géneros *Pseudomonas*, *Comomonas*, *Lophomonas*, *Zooglea*, *Sphaerotilus*, *Azotobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, grupo *coli*, *Micrococcus*, *Staphilococcus*, *Bacillus*, *Archrobacter*, *Nocardia* e *Mycobacterium* (Santos Oliveira, 1982).

2.3.2.1. Parede celular das bactérias

A parede celular está presente na grande maioria das bactérias, conferindo-lhes rigidez, dando-lhes forma e impedindo a lise osmótica. Em alguns casos pode contribuir para a

patogenicidade ou protegê-las da acção de certas substâncias tóxicas. Nas eubactérias o principal constituinte da parede é o peptidoglicano (ou mureína), cujo composto só se encontra neste tipo de bactérias.

A principal diferença entre as eubactérias Gram positivas e Gram negativas, está na estrutura das respectivas paredes. Nas bactérias Gram positivas, a parede é constituída por uma única camada espessa (20 a 100 nm) de peptidoglicano, representando este composto 60 a 90 % do peso seco da parede. Esta camada é atravessada por cadeias lineares de moléculas alternadas de dois compostos, um poliol e um fosfato, chamados de ácidos teicóicos. Estes compostos, são moléculas de carga negativa, que se ligam ao peptidoglicano e podem estar ancoradas na membrana celular, sendo neste caso designados de ácidos lipoteicóicos, e encontram-se apenas nas eubactérias Gram positivas. Por outro lado, as bactérias Gram negativas possuem uma parede celular mais complexa, existindo exteriormente à membrana plasmática, uma camada muito fina (1 a 3 nm) de peptidoglicano, representando este composto apenas 5 a 10 % do peso seco da parede, que é revestida por uma camada exterior com uma estrutura semelhante a uma membrana plasmática. O espaço que existe entre as duas membranas, a celular e a exterior, é designado por espaço periplasmático e contém várias enzimas envolvidas na aquisição de nutrientes pelas células (Lopes e Fonseca, 1986).

2.3.2.2. Bactérias formadoras de flocos

Os flocos são constituídos por diversas espécies de bactérias designadas de formadoras de flocos, representadas principalmente pelos géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Citromonas*, *Flavobacterium* e *Zooglea* (Lactema, 2010).

De acordo com um estudo de Soda *et al.* (1999), foram investigadas várias espécies que pareciam estar relacionadas com o processo de adsorção e floculação. Das 9 estirpes analisadas, *Citrobacter* sp. TKF04, *Gordonia amarae*, e *Sphingomonas paucimobilis* 551 (pSIO-45) mostraram propriedades semelhantes: elevada capacidade de formação de flocos, relativamente reduzidas taxas de crescimento específicas, e reduzida hidrofobicidade das células. No entanto, a estirpe *Sphingomonas paucimobilis* 551 (pSIO-45), foi a que exibiu maior capacidade de formação de flocos. Estas bactérias foram por isso neste estudo consideradas de bactérias *floc-forming*. Para além disso, *Gordonia amarae* é normalmente associada à formação de escumas, mas neste estudo e com a água residual sintética utilizada isto não se verificou (Soda *et al.*, 1999).

2.4. Meios de cultura

Os microrganismos precisam de nutrientes, uma fonte de energia e certamente condições ambientais apropriadas para poderem crescer e reproduzirem-se. No ambiente natural os microrganismos estão adaptados aos habitats mais favoráveis às suas necessidades, no entanto, no laboratório estas necessidades devem ser encontradas num meio de cultura. De qualquer forma, quer um organismo esteja presente num ambiente natural ou laboratorial, este deve fornecer todos os elementos químicos que compõem a matéria viva desse organismo, ou seja os nutrientes adequados e nas suas devidas proporções. O meio de cultura deve fornecer essencialmente os seguintes elementos: C, O, N, H, P, S, Na, K, Ca, Mg, Cl, Fe, Mn e oligoelementos. No entanto, os oligoelementos não necessitam de ser adicionados, visto que estes surgem na maioria dos casos como contaminantes dos sais utilizados. Um açúcar, que é muitas vezes utilizado como fonte de carbono ou energia é a glicose. Para além disso, para os microrganismos se reproduzirem devem estar presentes as condições adequadas de luz, pH, temperatura e pressão (Lopes e Fonseca, 1986; Metcalf e Eddy, 2003; Sigma-Aldrich, 2010).

Um meio de cultura é basicamente uma solução aquosa à qual se adicionam todos os compostos necessários. Existem diferentes categorias de meios de cultura, dependendo do tipo e combinação de nutrientes presentes, tal como se mostra na tabela 2.3 (Sigma-Aldrich, 2010).

Tabela 2.3 – Categorias de meios de cultura (Fonte: Sigma-Aldrich, 2010)

Meio de cultura	Objectivo de crescimento
Complexo	Crescem principalmente organismos heterotróficos
Definido	Crescem heterotróficos específicos e são muitas vezes obrigatórios para quimioheterotróficos, fotoautotróficos e ensaios microbiológicos
Selectivo	Inibem o crescimento de organismos não desejados, e favorecem o crescimento dos desejados
Diferencial	Distinguem colónias de microrganismos específicos de outros Semelhantes aos meios selectivos mas são concebidos para
Enriquecimento	aumentar os microrganismos desejados a um nível detectável, sem estimular o resto da população bacteriana
Redução	Crescem anaeróbios obrigatórios

Quando se pretende isolar microrganismos de ambientes naturais, devem fornecer-se condições de cultura semelhantes à desse ambiente. No entanto, uma vez que na maioria

dos casos muitos outros organismos estão presentes na nossa amostra, será aconselhável aplicar condições que favoreçam a multiplicação dos microrganismos a analisar, em detrimento de outros, ou seja as condições de isolamento devem ter em conta o enriquecimento da população do organismo pretendido, seleccionando-o tanto quanto possível dos outros.

Os meios de cultura devem ser tão bem definidos quanto possível. Quando se conhecem as necessidades nutritivas dos microrganismos, utilizam-se meios sintéticos, de composição química escolhida de acordo com resultados de estudos prévios. No entanto, na maioria das vezes não se conhecem estas necessidades dos microrganismos a cultivar, recorrendo-se nestes casos a meios contendo produtos naturais, por vezes provenientes do meio onde o organismo habita, como por exemplo extractos de carne, de levedura, de vegetais ou sangue. Quando a composição exacta do meio é desconhecida, então este é denominado de meio complexo (Lopes e Fonseca, 1986).

Os meios de cultura podem ser sólidos ou líquidos. Os meios sólidos são endurecidos com agar, e são normalmente preparados em placas de Petri. O agar agar é um polissacarídeo natural produzido por algas marinhas, e é o mais frequentemente utilizado como agente solidificante, normalmente numa concentração de 1,5% peso/volume. Por outro lado, os meios líquidos são mantidos em tubos inclinados. A utilização de meios cultura tanto sólidos como líquidos é adequada para manutenção de culturas em trabalhos laboratoriais, sendo no entanto exigido que sejam feitas frequentemente repicagens para meios frescos (Lopes e Fonseca, 1986; Sigma-Aldrich, 2010).

2.4.1. Técnicas de assepsia

Antes da inoculação com os microrganismos desejados, o meio microbiológico e todos os materiais em contacto com eles têm de ser esterilizados. Durante o manuseamento das culturas bacterianas, organismos não desejados ou contaminantes devem ser excluídos através do emprego de técnicas de assepsia. A esterilização implica a destruição completa de todos os organismos incluindo esporos, sendo isto acompanhado pela utilização de calor, químicos, radiação, filtração. As bactérias são mais facilmente destruídas através de calor húmido. Este processo é realizado com recurso a um autoclave, no qual se seguem ciclos de calor sob pressão durante um determinado período de tempo requerido. O ar deve ser primeiramente removido com vista a serem atingidos os 121°C para uma esterilização de sucesso (Sigma-Aldrich, 2010).

2.4.2. Preparação e distribuição de meios de cultura

Para a preparação e distribuição de meios de cultura devem ter-se em conta determinados procedimentos. Primeiramente devem ler-se as instruções do fornecedor do agar agar, de forma a saber-se a proporção adequada do mesmo a utilizar. Em seguida deve escolher-se uma receita apropriada para os microrganismos a cultivar. Depois, deve seguir-se um protocolo de microbiologia adequado de forma a preparar-se e distribuir-se o meio cultura, cumprindo todos os requisitos e tendo em conta as condições de assepsia (Abelho, 2010).

2.4.3. Obtenção de culturas puras

O crescimento de populações microbianas em meios de cultura no laboratório, permite a obtenção de culturas puras, que são culturas constituídas apenas por uma espécie, ao contrário das culturas mistas que contêm mais do que uma espécie de microrganismos. O isolamento permite assim a separação de uma espécie a partir de populações mistas.

As culturas puras podem ser obtidas através de um dos seguintes métodos:

- método das estrias ou de riscado em placa – método de isolamento bastante rápido que consiste na diluição de uma pequena porção de inóculo, colhida com uma ansa, a qual é sucessivamente riscada na superfície de um meio de cultura sólido. A execução do riscado pode ser feita por vários processos;

- método das diluições sucessivas – consiste na realização de diluições sucessivas da amostra, em condições de esterilidade, e posterior inoculação em caixas de Petri. Neste caso a inoculação pode ser feita por espalhamento em placa, em camada dupla ou por incorporação.

Tanto para um método, como para outro, verifica-se o desenvolvimento de uma população a partir de uma única célula inicial, mas mesmo assim é importante fazer subculturas a partir de uma colónia isolada para certificação da pureza das culturas. O crescimento dos microrganismos em meio sólido dá origem à formação de colónias, que são crescimentos macroscopicamente visíveis resultantes da multiplicação celular. Se as colónias microbianas estiverem completamente dispersas, cada uma corresponde a um conjunto de bactérias em estado viável e cultivável.

Após a obtenção de uma cultura pura, a sua manutenção em laboratório deve garantir que os microrganismos permaneçam viáveis, geneticamente homogêneos e protegidos de posteriores contaminações. As culturas podem ser mantidas em refrigeração a 4°C, em congelação a -20°C, -70°C ou em azoto líquido (-180°C) ou serem liofilizadas. Para

conservação a longo prazo deverão usar-se substâncias crioprotectoras, como por exemplo o glicerol.

Para inoculação por incorporação deve manter-se o meio de cultura (sólido) liquefeito num banho a 45°C, uma vez que o agar começa a solidificar a 44°C. Retirar com uma pipeta esterilizada, um volume de amostra e colocá-lo no fundo da caixa de Petri também esterilizada, entreabrindo apenas o mínimo indispensável. Em seguida, tirar a rolha do tubo que contém o meio liquefeito, passar a boca do mesmo pela chama e verter de uma só vez o conteúdo na caixa de Petri. Para incorporar o inóculo no meio de cultura, deve manter-se a caixa bem assente no tampo da bancada e agitar segundo movimentos circulares e rectilíneos em direcções opostas, evitando que o agar toque na tampa da placa. Depois, deixar repousar e solidificar. Após a solidificação do meio, a placa a incubar deve ser invertida durante cerca de dois dias.

Para inoculação por espalhamento em placa deve pipetar-se uma gota para a superfície do meio de cultura solidificado e em seguida com um espalhador de vidro estéril espalhar o inóculo por toda a superfície da placa, rodando-a simultaneamente. Por último, a placa invertida deve ser incubada durante cerca de dois dias.

Por fim, para inoculação por riscado em placa deve ser escolhida uma colónia isolada, e com uma ansa esterilizada e arrefecida tocar na colónia. Em seguida, com a ansa, a superfície do agar deve ser riscada de forma a que se esgote completamente o material contido na ansa. Da mesma forma que anteriormente a placa invertida deve ser incubada durante cerca de uma semana. O objectivo do riscado é o esgotamento do inóculo e a obtenção de uma colónia derivada de uma única célula inicial (Abelho, 2010).

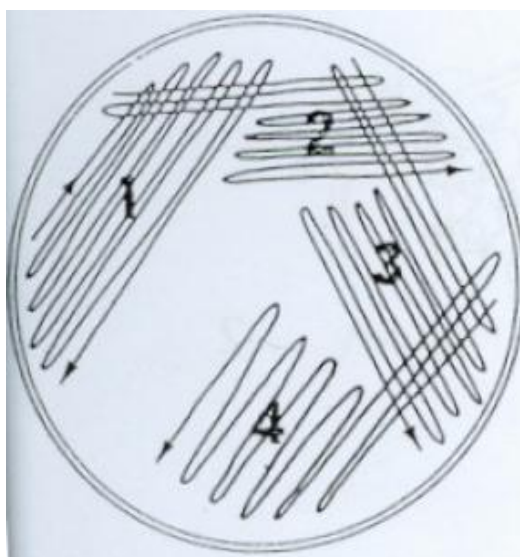


Figura 2.7 – Exemplo de riscado em placa (Fonte: Abelho, 2010)

2.5. Métodos de identificação de bactérias

Certas condições em sistemas de tratamento de águas residuais, como por exemplo em sistemas de lamas activadas, podem ser controladas para criar pressões selectivas que irão favorecer o crescimento de organismos desejáveis, em detrimento de outros. Sendo assim a identificação dos microrganismos e das suas características metabólicas é muito importante.

No passado, os métodos utilizados para identificação de bactérias baseavam-se na taxonomia física (morfologia) e características metabólicas (análise do fenótipo). Com as ferramentas modernas da biologia molecular, a identificação de bactérias passou a ser baseada na informação genética celular. A unidade taxonómica básica de identificação de bactérias é a espécie, que representa um conjunto de estirpes de bactérias semelhantes que exibem características significativamente diferentes de outros grupos de bactérias.

Assim, a classificação taxonómica e os métodos convencionais taxonómicos utilizados para identificação de uma bactéria baseiam-se nas propriedades físicas e nas características metabólicas da mesma. Para aplicar esta classificação é indispensável a obtenção prévia de uma cultura pura da bactéria a identificar. Os tipos de testes que se podem utilizar para caracterizar uma cultura pura são: (i) observação microscópica, para determinar a morfologia (tamanho e forma); (ii) coloração de Gram, para determinar se a parede celular bacteriana absorve o corante de violeta de cristal; (iii) o tipo de aceitador de electrões (por exemplo O_2 , CO_2) utilizado nas reacções de oxidação-redução; (iv) o tipo de fonte de carbono utilizada para o crescimento celular; (v) a capacidade de utilização de várias fontes de azoto e enxofre; (vi) necessidades nutricionais; (vii) química da parede celular; (viii) características celulares incluindo pigmentos, segmentos, inclusões celulares, e produtos de armazenamento; (ix) resistência a antibióticos; (x) efeitos ambientais da temperatura e pH (Metcalf e Eddy, 2003).

Por outro lado, a classificação filogenética consiste na caracterização dos microrganismos baseada na informação genética e localização no tempo da sua evolução, denominada de filogenia, que é mais do que um método corrente de identificação e classificação. Para identificar microrganismos e determinar as verdadeiras relações evolutivas entre espécies, a escolha do material genético celular é crítica. O código genético da subunidade 16 do RNA ribossómico (16S rRNA) foi escolhido como cronómetro de evolução para a identificação celular, visto que tem uma importância de evolução significativa e contém um grande número de sequências nucleotídicas, sendo portanto a semelhança entre sequências de rRNA de dois organismos que indica a relação filogenética. A filogenia molecular envolve uma organização sistemática e classificação dos microrganismos baseada nas suas características genéticas.

Foi desde 1970, com Carl Woese e seus colegas que se começou a investigar, catalogar e diferenciar a filogenia dos procariontes através das sequências de 16S rRNA. Foi então criada uma árvore filogenética da vida de três grandes linhas de descendência, com base nesta sequenciação. As três grandes linhas de descendência são *Archaea*, *Bacteria* e *Eucarya*, que são normalmente conhecidas como Arqueobactérias, Eubactérias e Eucariontes, respectivamente (Busse *et. al.*, 1996; Metcalf e Eddy, 2003).

De forma a obter estas classificações filogenéticas para identificações de microrganismos mais minuciosas são utilizados métodos moleculares que podem analisar características nutricionais e bioquímicas, ácidos gordos, *respiratory isoprenoid quinones*, poliaminas, diaminoácidos, ácidos micólicos, lípidos polares, açúcares, conteúdo em guanina + citosina ou podem utilizar outros métodos como métodos analíticos de impressões digitais, comparação dos padrões de proteínas e LPS- ladders após PAGE, análises do DNA genómico por RFLP, análise macrorestrita do DNA genómico por PFGE, *random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns*, detecção de bactérias utilizando sondas de DNA, hibridações DNA:DNA, hibridações DNA:rRNA, análise do 16S rRNA, electroforese de gel de gradiente de desnaturação. No entanto, por mais complexo que seja o método, é importante realçar que para qualquer um deles é necessário obter uma cultura pura previamente à identificação dos microrganismos pretendidos (Busse *et. al.*, 1996).

2.5.1. Observação microscópica

Uma das ferramentas mais utilizadas para conhecer o estado de um reactor biológico, e que deveria ser utilizada diariamente, é a observação microscópica do licor misto. Uma examinação frequente deste tipo, permite diagnosticar alterações da biomassa do tanque de arejamento, prever o seu aparecimento e verificar possíveis alterações do desempenho do processo, de forma a identificar se será necessário uma acção correctiva previamente a um problema mais severo. Para auxílio da visualização microscópica, normalmente utilizam-se corantes, conseguindo-se assim realçar mais facilmente as características da lama (Eckenfelder *et al.*, 1986; Lactema, 2010; Metcalf e Eddy, 2003).

2.5.1.1. Colorações

A coloração de preparações pode ter como objectivos:

- aumento do contraste entre as células e o meio, visto que o índice de refração do protoplasma bacteriano é muito semelhante ao do meio circundante, tornando difícil a examinação das bactérias de preparações não coradas.

Outra forma de examinação das bactérias sem recurso à utilização de corantes é a utilização de métodos especiais de iluminação como por exemplo através da microscopia de contraste de fase;

- diferenciação de organismos que reagem de modo diferente ao mesmo corante, através da utilização de colorações diferenciais;

- observação de estruturas particulares, como por exemplo paredes celulares, material nucleico, esporos, cápsula, etc (Abelho, 2010).

2.5.1.1.1. Coloração com hematoxilina e eosina

Em muitas das colorações, ocorrem reacções químicas entre o corante e a substância corada tais como ligações de sais, pontes de hidrogénio, ou outras. A utilização de corantes como estes resulta numa cor previsível, baseada nas características ácido base do tecido. Muitos dos corantes histológicos são classificados de ácidos ou básicos, conforme são negativamente ou positivamente carregados em solução, respectivamente.

Na coloração com hematoxilina e eosina, o complexo hematoxilina-metal actua como um corante básico e a eosina como corante ácido. As substâncias que são coradas por um corante básico são denominadas de basófilas e as que são coradas por um corante ácido são denominadas de acidófilas. O complexo hematoxilina-metal cora as estruturas basófilas, ácidos nucleicos no núcleo, de azul. Por outro lado, a eosina, corante de contraste, cora as estruturas acidófilas, citoplasma e espaços extracelulares, de rosa a vermelho (Pharmaness, 2010; University of Florida, 2010).

2.5.1.1.2. Coloração de Gram

A coloração de Gram é um método de microscopia óptica desenvolvido por Hans Christian Gram na Dinamarca, em 1884 e que permite distinguir as células microbianas em Gram positivas e Gram negativas, conforme reagem à aplicação sequencial de uma série de corantes. Neste método de coloração diferencial, o corante catiónico cristal de violeta é utilizado para corar os ácidos nucleicos e os tecidos envolventes dos microrganismos. O cristal de violeta é depois ligado ao iodo de Gram, formando um complexo negro, de violeta de cristal - iodo. Em seguida, é aplicado um solvente orgânico, como o álcool ou a acetona, e depois safranina como corante de contraste. Nas bactérias Gram negativas, o solvente orgânico remove os lípidos da membrana externa da parede celular, aumentando a sua permeabilidade. Desta forma, o complexo violeta de cristal – iodo anteriormente formado,

passa a poder ser removido, descorando as bactérias, tomando estas a coloração do corante de contraste, a safranina, aplicado posteriormente. Pelo contrário, nas bactérias Gram positivas, o tratamento com um solvente orgânico apenas resulta na sua desidratação com redução da permeabilidade, e consequentemente retenção do complexo. Assim, os microrganismos corados de violeta-preto são denominados de Gram positivos, e os microrganismos que tomam a cor do corante de contraste (vermelha), são denominados de Gram negativos.

Esta distinção está relacionada com a composição da parede celular das bactérias e é uma característica taxonómica bastante importante, sendo utilizada numa fase inicial de identificação das bactérias. Este método é útil para avaliar se existe contaminação bacteriana de amostras de culturas, ou para examinar o estado e características morfológicas de culturas bacterianas mistas ou puras (Abelho, 2010; Coico, 1997; Ellis; Lopes e Fonseca, 1986).

A coloração é realizada sobre um esfregaço esparso, numa lâmina de microscópio previamente desengordurada. Observam-se as lâminas directamente (sem lamela) ao microscópio óptico, sobre óleo de imersão e com uma ampliação de 1000x. Na tabela 2.4, estão descritas as cores observadas durante a aplicação deste método. (Coico, 1997; Lopes e Fonseca, 1986).

Tabela 2.4 – Cores observadas durante a aplicação do método de coloração de Gram (Fonte: Lopes e Fonseca, 1986)

	Bactérias Gram positivas	Bactérias Gram negativas
Cristal de violeta	Violeta	Violeta
Soluto de iodo	Violeta	Violeta
Álcool	Violeta	Incolor
Safranina	Violeta	Vermelha

2.5.1.1.3. Teste da potassa cáustica

Tal como a coloração de Gram, o teste da potassa cáustica também permite a distinção entre bactérias Gram positivas e Gram negativas. Porém, este teste baseia-se na diferença de resistência ao tratamento com hidróxido de potássio (KOH).

No teste da potassa cáustica, deita-se numa lâmina uma gota de KOH a 3% sobre uma amostra de cultura pura da bactéria a analisar, cultivada em meio sólido. Mistura-se com a ajuda de uma ansa de repicagem durante 5 a 10 segundos. Após este tempo,

eleva-se a ansa cerca de 1 cm e observa-se se se formou ou não um fio de uma substância viscosa entre a ansa e a lâmina. No caso de se ter formado este fio de substância viscosa está-se perante bactérias Gram negativas. Pelo contrário, se não houver formação do mesmo, ficando a mistura com um aspecto aquoso, tratam-se de bactérias Gram positivas. A formação de um fio de substância viscosa, no caso das bactérias Gram negativas, tal como descrito anteriormente, atribui-se à saída de DNA das células destas bactérias, por destruição da sua parede celular pelo hidróxido de potássio (Lopes e Fonseca, 1986).

2.5.2. API

O API (Índice de Perfil Analítico), é um método baseado no conceito de identificação numérica, tornando a identificação microbiana fácil, rápida e fiável. Esta metodologia é actualmente considerada como de referência, na forma como é utilizada para avaliar qualquer novo sistema de identificação a integrar no mercado, e sendo utilizada como base de aprendizagem sobre identificação microbiológica na maioria das escolas (BioMérieux).

Diferentes kits API foram desenhados para vários grupos de bactérias, por exemplo *Enterobacteriaceae*, *Lactobacilli* e anaeróbias. Estes kits têm em comum a mesma forma de construção, consistindo os testes individuais em cúpulas numa galeria de plástico com químicos desidratados, que para identificação são inoculados com uma suspensão bacteriana (Holmes *et al.*, 1978).

A gama de kits API tem representado uma grande revolução no campo de identificação de microrganismos. Actualmente, devido aos desenvolvimentos desta técnica, é possível complementar a identificação manual através de uma ferramenta de software, o apiweb, no caso da BioMérieux. Esta técnica permite actualmente a identificação de pelo menos 600 espécies de bactérias e leveduras.

Este método, devido a não necessitar de um investimento significativo, necessitar de um tempo de formação muito curto e possuir um prazo de validade bastante longo fazem da gama API um método de identificação de rotina muito económico. Para além disso, é um método rápido, que permite obter resultados entre 18 a 24 horas, ou em 4 horas pela gama rapid (BioMérieux).

2.5.2.1. API 20E

O kit API 20E surgiu no Reino Unido em 1971. O sistema API 20E é uma versão normalizada e miniaturizada dos procedimentos convencionais para uma identificação

rápida de *Enterobacteriaceae* e outras bactérias Gram negativas. A principal vantagem do sistema API 20E é que é mais conveniente e fácil de identificar bactérias Gram negativas do que pelos testes convencionais. Este sistema utiliza 20 compartimentos de reacção miniatura (cúpulas) que produzem 23 reacções bioquímicas (Holmes *et al.*, 1978; Juang e Morgan, 2001).

Os resultados obtidos através da utilização do kit são convertidos num código numérico, no chamado perfil do organismo, que pode ser depois descodificado. Existem três kits API disponíveis para identificação das *Enterobacteriaceae* e outras bactérias Gram negativas, que são o kit de 10 testes (10S), o kit básico de 20 testes (20E), e para uma maior caracterização o kit de 50 testes (50E). O kit 20 E contém todos os testes que o kit 10S contém, mas não contém todos os testes que o kit 50E contém (Holmes *et al.*, 1978).

De acordo com os resultados de um estudo de Juang e Morgan (2001), concluiu-se que o sistema API 20E pode ser aplicado apenas ao nível do género, sendo necessário vários outros testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos adicionais para se obter a classificação exacta de cada microrganismo ao nível da espécie. Tecnologias mais complexas como a análise do 16S rRNA podem vir a ser necessárias (Juang e Morgan, 2001).



Figura 2.8 – Galerias API 20 E (Fonte: BioMérieux)

2.5.3. MALDI-TOF MS

A espectrometria de massa (MS – “mass spectrometry”) é uma técnica que surgiu no início do século XX. Em contraste com as técnicas analíticas, a espectrometria de massa é bastante específica porque permite medir uma propriedade intrínseca da molécula, o peso molecular, com elevada sensibilidade, precisão e exactidão. Desde os anos 1980 e em maior escala nos anos 1990, esta técnica tem desempenhado um papel cada vez mais significativo, e devido às suas capacidades tem sido utilizada numa grande variedade de aplicações (Lewis *et al.*, 2000; Mann *et al.*, 2001).

A espectrometria de massa está na base de quase toda a experimentação em proteómica, na medida em que fornece as principais ferramentas para análise das proteínas. Os métodos correntes de MS são altamente sensíveis e podem identificar qualquer proteína cuja sequência genómica seja conhecida. As estratégias mais comuns de MS analisam péptidos em vez de todo o comprimento das proteínas, recorrendo para tal à sua digestão prévia (Guerrera e Kleiner, 2005).

Correntemente, a utilização de espectrometria de massa em proteómica está presente em três áreas principais. A espectrometria de massa é a técnica preferida para caracterização e controlo de qualidade de proteínas recombinantes e outras macromoléculas, uma tarefa importante no campo da biotecnologia. É também comumente utilizada para identificação de proteínas, tanto em projectos bioquímicos clássicos ou proteómicos de grande escala. Finalmente, porque a MS mede o peso molecular das proteínas, é o método de eleição para detecção e caracterização de modificações pós-translacionais e potencialmente pode identificar qualquer modificação covalente que altere a massa da proteína (Mann *et al.*, 2001).

Os espectrómetros de massa são constituídos por três componentes básicos: uma fonte iónica, um analisador de massa e um detector de iões. As medições de espectrometria de massa são realizadas nos analitos (amostras) ionizados na fase gasosa, requerendo para tal a transferência das moléculas da solução ou da fase sólida, para o estado pretendido (gasoso). As duas técnicas de MS mais utilizadas são o MALDI – “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation” e o ESI – “ElectroSpray Ionisation”. Tanto o MALDI como o ESI são técnicas simples de ionização nas quais os iões são criados com fracas energias internas, sofrendo portanto pequenas fragmentações (Guerrera e Kleiner, 2005).

2.5.3.1. Método de ionização de MALDI

A espectrometria de massa “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation” (MALDI MS) foi pela primeira vez introduzida por Hillenkamp e Karas em 1988, tendo-se tornado uma ferramenta analítica generalizada para análise de péptidos, proteínas e muitas outras biomoléculas (oligonucleótidos, carboidratos, produtos naturais e lípidos) (Lewis *et. al.*, 2000).

No MALDI as amostras são co-cristalizadas com um grande excesso molar de um composto de matriz, usualmente um ácido orgânico com fraca absorção de ultravioleta (UV), num alvo metálico. Um laser pulsado é utilizado para excitar a matriz, que causa um aquecimento térmico rápido das moléculas e eventualmente desorção dos iões para a fase gasosa. O MALDI proporciona a evaporação e ionização não destrutiva de biomoléculas tanto grandes

como pequenas. Na figura 2.9 mostra-se o funcionamento geral do MALDI (Guerrera e Kleiner, 2005; Lewis et. al., 2000).

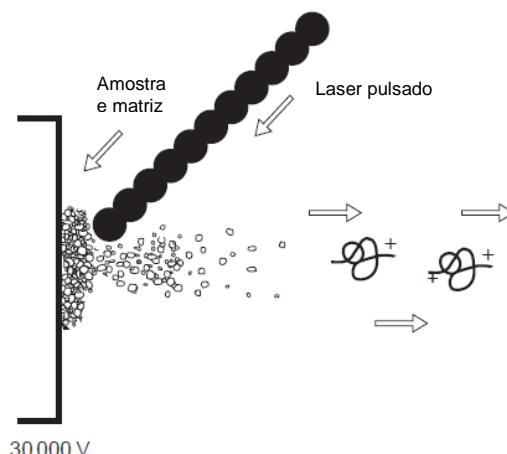


Figura 2.9 – Funcionamento do MALDI (Fonte: Adaptado de Lewis et. al., 2000)

A matriz desempenha portanto o papel fundamental de absorver fortemente a energia da luz laser, causando indirectamente a evaporação do “analito”. A matriz também serve como um doador e receptor de prótons, actuando para ionizar o “analito” tanto nos modos de ionização positivos como negativos, respectivamente. Devido à utilização de laser pulsado, o MALDI produz grupos de iões em vez de um feixe contínuo de iões (como é o caso do ESI) (Guerrera e Kleiner, 2005; Lewis et. al., 2000; Mann *et al.*, 2001).

Geralmente a ionização ocorre através de transferência de prótons. Segundo Lewis et. al., (2000) a ionização depende criticamente da combinação matriz/analito, mas não depende de forma crítica do número de grupos ácidos ou básicos do analito, sugerindo isto que uma interacção mais completa do analito e da matriz, em vez de uma química simples ácido base, é responsável pela ionização deste composto (Lewis et. al., 2000).

A técnica de ionização de MALDI tolera uma quantidade razoável de impurezas na amostra a analisar. Para além disso, pode ser considerado como vantagem desta técnica, muitas amostras diferentes poderem ser processadas rapidamente de uma forma automatizada e estas poderem ser mantidas no alvo por vários dias sem comprometer a qualidade da análise, permitindo reanalisar facilmente sempre que necessário (Guerrera e Kleiner, 2005).

Segundo Guerrero e Kleiner (2005), existem também certas desvantagens do MALDI relativamente ao ESI. O ESI “ion trap” e o ESI Q/TOF são os métodos mais comuns para análise simultânea de grandes números de péptidos derivados da digestão enzimática de misturas complexas de proteínas. Isto deve-se principalmente à capacidade de interface de métodos cromatográficos online de fraccionamento de péptidos com o ESI e a possibilidade

de obter não apenas uma massa mas também informação sequencial da proteína. A informação sequencial da proteína presente no espectro de MS permite depois ser comparada com bases de dados de sequências de proteínas abrangentes. A outra principal vantagem do ESI em relação ao MALDI, é a produção de iões carregados multiplamente, o que permite a medição de péptidos de elevado peso molecular, muitas vezes negligenciados pela análise de MALDI-TOF (Guerrera e Kleiner, 2005).

2.5.3.2. Espectrómetro de massa MALDI-TOF

Após ionização, a amostra atinge o analisador de massa, que separa iões pelas suas razões massa/carga (m/z – “mass-to-charge”). O movimento dos iões do analisador de massa pode ser manipulado por campos eléctricos ou magnéticos para direccionar os iões para o detector, que regista os valores de m/z de cada ião. Em investigações de proteómica, quatro tipos básicos de analisadores de massa são correntemente utilizados: “time-of-flight” (TOF), “ion trap”, “quadrupole”, e “Fourier transform ion cyclotron resonance” (FTICR). Todos os quatro diferem consideravelmente na sensibilidade, resolução, precisão de massa e possibilidade de fragmentar iões de péptidos (Guerrera e Kleiner, 2005).

A análise TOF é baseada na aceleração de um conjunto de iões para um detector, onde é dada a mesma quantidade de energia a todos os iões. Porque os iões têm todos a mesma quantidade de energia, ainda que uma massa diferente, os iões atingem o detector em diferentes tempos. Os iões mais pequenos atingem o detector primeiro devido à sua maior velocidade, enquanto que os iões maiores demoram mais tempo devido à sua maior massa. Daí que o analisador seja chamado de TOF (tempo de voo) já que a massa é determinada pelo tempo de voo dos iões, podendo assim obter-se um espectro de massa. O tempo de chegada ao detector é dependente da massa, carga e energia cinética do ião, segundo a equação $E_c = 1/2 mv^2$ (Guerrera e Kleiner, 2005; Lewis et. al., 2000; Mann et al., 2001).

No entanto, a maior desvantagem destes analisadores (TOF) é a sua incapacidade para realizar um verdadeiro espectro de massa. No entanto, este problema foi superado através do desenvolvimento recente de instrumentos como TOF/TOF e Q/TOF. Estes dois instrumentos têm elevada sensibilidade, resolução e precisão de massa. De acordo com Guerrero e Kleiner (2005), os espectros de iões fragmentados resultantes são muitas vezes mais extensivos e informativos do que aqueles que são gerados por instrumentos “trapping” (Guerrera e Kleiner, 2005).

De acordo com Guerrero e Kleiner (2005), a espectrometria de massa MALDI-TOF é relativamente simples e robusta de operar, tem uma boa precisão de massa, elevada resolução e sensibilidade. Esta é largamente utilizada em proteómica para identificar

proteínas provenientes de misturas simples. Mas segundo Lewis *et al.* (2000) apesar de o MALDI ser muitas vezes combinado com analisadores de massa TOF, a sua resolução um pouco limitada (10^2 - 10^4) resulta numa precisão da ordem dos 0,2% até uma mais elevada de 0,005% (com calibração interna). Alternativamente, os instrumentos de MALDI estão a ser também associados a analisadores de resolução ultra elevada ($>10^5$) como o analisador de massa “Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (ICR)” (Guerrera e Kleiner, 2005; Lewis *et al.*, 2000).

Um desenvolvimento relativamente recente na aplicação de espectrometria de massa em proteómica é a utilização da espectrometria de massa de MALDI-TOF para estabelecer perfis e imagens das proteínas directamente dos cortes de tecido fino, uma tecnologia conhecida como perfis de proteínas e espectrometria de massa de imagem (“Protein Profiling and Imaging Mass Spectrometry (IMS)”. A IMS fornece informação específica da composição molecular local, abundância relativa e distribuição espacial dos péptidos e proteínas na secção analisada. O IMS é uma ferramenta de investigação de descoberta muito promissora, porque as proteínas reportadas não têm de ser conhecidas. No entanto, como o IMS é baseado na espectrometria de massa de MALDI-TOF, tem todas as limitações físicas ligadas a esta à aplicação desta técnica, levando à má resolução de massa para sinais acima de m/z de 50 000 e o facto de aproximadamente 90% dos sinais observados estar abaixo de m/z de 30 000 (Guerrera e Kleiner, 2005).

2.5.3.3. Preparação da amostra

Os espectrómetros de massa de MALDI são uma ferramenta importante para a determinação precisa da massa das misturas de péptidos. No entanto, esta precisão é altamente dependente da amostra e da sua preparação. A aquisição de bons dados a partir do MALDI depende da escolha das matrizes e dos solventes adequados, das propriedades funcionais e estruturais do analito, da pureza da amostra, e de como a amostra é preparada no prato de amostra do MALDI. Visto que a matriz é meio pelo qual o analito é transportado para a fase gasosa e fornece as condições que tornam a ionização possível, uma contaminação da amostra com excesso de sais (>10 mM) irá afectar estas condições e levar a uma redução da sensibilidade (Lewis *et al.*, 2000).

Para péptidos e proteínas, as matrizes standard são o ácido α -cyano-4-hydroxycinnamic (1) (α -cyano ou CCA), o ácido 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic (2) (ácido *sinapinic* ou SA), e o ácido 2,5-dihydroxybenzoic (3) (DHB). As respectivas fórmulas químicas destas matrizes mostram-se na figura 2.10 (Lewis *et al.*, 2000; Mann *et al.*, 2001).

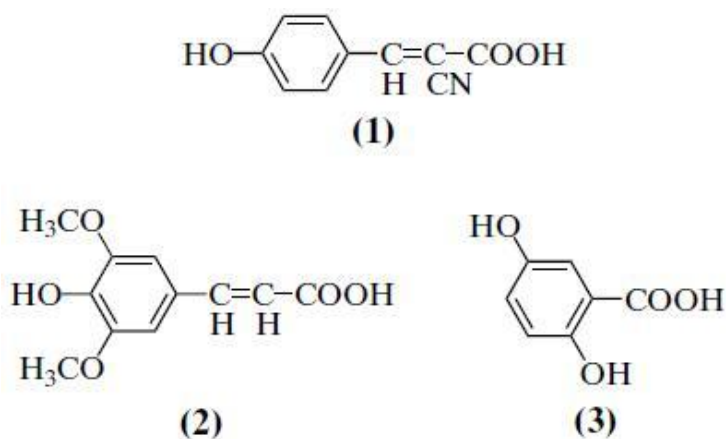


Figura 2.10 – (1) - ácido α -cyano-4-hydroxycinnamic (CCA); (2) - ácido 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic (SA); (3) - ácido 2,5-dihydroxybenzoic (DHB) (Fonte: Lewis et. al., 2000)

O CCA é principalmente utilizado para péptidos, glicopéptidos e pequenas proteínas. O SA é comumente utilizado tanto para análise de péptidos e proteínas e o DHB é utilizado para glicopéptidos, glicoproteínas, pequenas proteínas e oligonucleótidos (< 10 bases). Na análise de proteínas digeridas (mapa de péptidos), a escolha da matriz tem um papel muito importante na observação dos péptidos produzidos. Os procedimentos de preparação da amostra/matriz influenciam muito a qualidade do espectro de massa de MALDI dos péptidos ou proteínas. Entre a variedade de métodos de preparação reportados, o método *dried-droplet* é o mais frequentemente utilizado (Lewis et. al., 2000).

Qualquer que seja a metodologia utilizada, as proteínas devem ser transformadas nos seus péptidos componentes antes da identificação de proteínas propriamente dita (Capelo *et al.*, 2009).

Em metodologias com recurso à não utilização de gel, para obter o conjunto de péptidos é necessário desempenhar quatro passos principais: (i) solubilização/desnaturação; (ii) redução; (iii) alquilação e (iv) digestão. Estes passos são essenciais para tornar a clivagem enzimática mais efectiva. No entanto, estes passos dependem do tamanho da proteína e do número de resíduos de cisteína. As cisteínas formam pontes di-sulfito que têm como objectivo a manutenção da estrutura da proteína, necessitando assim de ser bloqueadas, através da redução e alquilação que garantem a desnaturação completa das proteínas. Quando se analisam misturas complexas, devido à grande quantidade de proteínas presente, os passos (i) a (iii) são obrigatórios. Nalguns casos ainda, podem também ser necessários alguns pré-tratamentos previamente à realização destes passos (Capelo *et al.*, 2009).

2.5.3.3.1. Solubilização/desnaturação das proteínas

Neste passo é utilizada uma solução tampão, como por exemplo bicarbonato de amónia, *ambic*, suplementado com ureia 8M, ou qualquer outro agente do mesmo tipo, com o objectivo de quebrar forças intramoleculares para obter solubilização/desnaturação das proteínas. Se estiverem presentes elevadas concentrações de sais, o processo de ionização é impedido em fontes comuns de ionização, como é o caso da espectrometria de massa de MALDI-TOF ou de ESI. Sendo assim, no final do tratamento, é obrigatória a realização de um processo de dessalinização. A razão tampão/solução deve ser cuidadosamente escolhida para evitar a ocorrência de precipitação de proteínas. A desnaturação pode também ser feita por aquecimento durante 5 a 10 minutos, a 95°C, sendo este método no entanto reversível. Neste caso, o tratamento da amostra deve ser feito rapidamente para evitar a renaturação das proteínas (Capelo *et al.*, 2009).

2.5.3.3.2. Redução das proteínas

Após a desnaturação das proteínas, a amostra deve ser reduzida utilizando um reagente para o efeito, como por exemplo o dL-dithiothreitol (DTE), ou outro. Este passo tem o objectivo de facilitar o próximo passo de alquilação (Capelo *et al.*, 2009).

2.5.3.3.3. Alquilação das proteínas

Após a redução, as ligações di-sulfito estão bloqueadas garantindo uma desnaturação completa das proteínas e facilitando a acção da enzima para quebrar as ligações dos péptidos da cadeia proteica (Capelo *et al.*, 2009).

2.5.3.3.4. Digestão das proteínas

Este é considerado o passo mais importante, uma vez que uma boa digestão garante uma elevada concentração de péptidos, facilitando assim a identificação da proteína. Diferentes tipos de enzimas podem ser utilizados neste passo, dependendo do propósito da análise. A tripsina é de longe a enzima mais comumente utilizada neste passo, podendo clivar as ligações dos péptidos predominantemente do lado carboxilo dos aminoácidos lisina e arginina, produzindo um conjunto reprodutível de péptidos, geralmente com tamanhos compreendidos entre 600 a 2 500 Da. Este tamanho de péptidos é adequado para trabalhar com espectrometrias de massa, de MALDI ou ESI. Outras enzimas podem também ser utilizadas, como a endoproteínase Lys-C e a endoproteínase Glu-C. A escolha do tipo de

enzimas a utilizar depende do estudo que se pretende fazer. Por exemplo, a tripsina tem uma actividade reduzida para uma concentração de ureia de 8M, que geralmente é a concentração utilizada para desempenhar a desnaturação de proteínas. Por esse motivo, a amostra precisa de ser diluída, para uma concentração de ureia de 2M, para facilitar a acção da tripsina. Para evitar a diluição, a tripsina pode ser substituída pela Lys-C desde que esta enzima mantenha a sua actividade a uma concentração de ureia de 8M.

Qualquer que seja a enzima escolhida para trabalhar, o passo da digestão é o mais importante em termos de tempo em qualquer metodologia tradicional de identificação de proteínas, podendo atingir cerca de 24 horas no caso de amostras complexas. De qualquer forma, este longo tempo não traz garantia de sucesso em termos de reprodutibilidade de rendimento da digestão de amostra para amostra. A heterogeneidade da matriz, a quantidade, número e complexidade das proteínas tornam às vezes a digestão um processo difícil de reproduzir.

A digestão das amostras pode ser feita de duas formas diferentes. As enzimas podem ser utilizadas em solução (fase homogénea) ou imobilizadas em suportes sólidos (fase heterogénea) (Capelo *et al.*, 2009).

Em metodologias com recurso à utilização de gel, alguns passos são comuns às abordagens baseadas na não utilização de gel, nomeadamente a desnaturação, redução, alquilação e digestão das proteínas. No entanto, desde que as proteínas são separadas através de electroforese de gel na primeira ou segunda dimensão, as peças de gel necessitam de ser manuseadas, tornando o tratamento das amostras tedioso e consumidor de tempo. A execução do gel é obrigatória, tomando de uma a quatro horas para a primeira dimensão e entre 48 a 72 horas para a segunda dimensão. Uma vez separadas, as proteínas podem ser visualizadas no gel. Consequentemente, o gel é colorido e depois descolorido para visualização das proteínas. As manchas de gel contendo as proteínas são depois excitadas e submetidas a tratamento apropriado da amostra, para obter o conjunto de péptidos que será utilizado mais tarde para caracterização das proteínas através de espectrometria de massa.

As abordagens clássicas implicam muitos passos de limpeza, desidratação e incubação do gel. Muitos dos esforços desenvolvidos hoje em dia nas abordagens baseadas na utilização de gel, vão na direcção de reduzir o número de passos, simplificando assim o manuseamento focando também a redução de tempo consumido para desempenhar cada passo.

Segundo Capelo *et al.* (2009), muitos dos problemas relacionados com a utilização da maioria dos dispositivos modernos disponíveis para acelerar as metodologias da identificação de proteínas, nas abordagens baseadas na utilização de gel, estão relacionadas com as dificuldades no manuseamento das peças de gel (Capelo *et al.*, 2009).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta dissertação foi elaborada em diferentes etapas, nomeadamente e inicialmente numa revisão da literatura, seguida de uma fase experimental. Esta última consistiu numa amostragem, preparação de meios de cultura, obtenção de culturas puras, para posterior coloração e observação microscópica e, aplicação dos métodos API e MALDI-TOF MS.

3.1. Amostragem

Foi colhida uma amostra do licor misto do tanque de arejamento da ETAR de Santa Cruz, em Torres Vedras, no dia 1 de Julho de 2010, suficiente para elaboração da componente experimental apresentada nesta dissertação. Esta foi devidamente refrigerada, para conservação até à sua utilização. Nas figuras seguintes, é possível verificar o aspecto do tanque de arejamento e do decantador secundário da ETAR, respectivamente.



Figura 3.1 – (a) e (b) Tanque de arejamento da ETAR de Santa Cruz



Figura 3.2 – (a) e (b) Decantador secundário da ETAR de Santa Cruz

3.2. Preparação de meios culturas

Para a preparação e inoculação dos meios de cultura foi utilizado o protocolo de Abelho (2010).

Os organismos formadores de flocos, que se pretendiam identificar encontram-se naturalmente sempre presentes nas águas residuais, tendo-se por isso escolhido um meio de cultura simples e não selectivo. A composição do meio de cultura sólido utilizado para crescimento de bactérias floculentas segundo o *National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures* foi:

Yeast-glucose agar (YGA)

- Glucose 20,0 g
- Extracto de levedura 10,0 g
- Agar 15,0 g
- Água destilada 1,0 L

Para a pesagem dos componentes necessários à preparação do meio de cultura utilizou-se uma balança analítica, Mettler AE200 (EUA) (figura 3.3 (a)). A proporção de agar utilizada foi de 1,5% peso / volume, da marca Pronagar (Espanha) (figura 3.3 (b)).

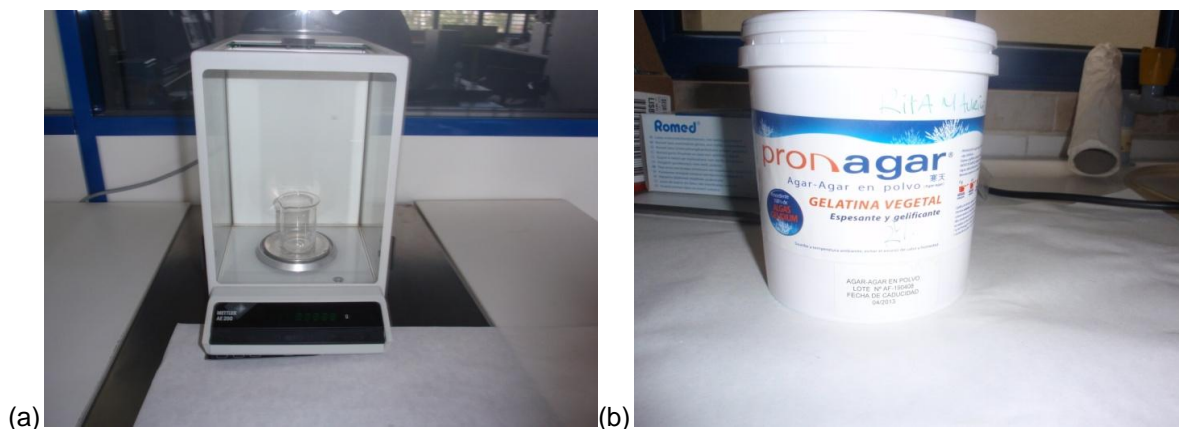


Figura 3.3 – (a) Balança analítica; (b) Agar da Pronagar

Os reagentes foram adicionados a um Erlenmeyer (500 mL), perfazendo com água destilada até atingir o volume necessário, e aqueceu-se a solução de meio de cultura numa placa de aquecimento, Heidolph VV-micro (Alemanha) (figura 3.4).



Figura 3.4 – Aquecimento da solução de meio de cultura na placa de aquecimento

A preparação do meio de cultura foi realizada com as técnicas de assepsia recomendadas e aplicáveis à preparação de culturas não contaminadas por factores externos (Sigma-Aldrich).

Seguidamente, foram preparadas as caixas de Petri e o Erlenmeyer com o meio de cultura aquecido para serem esterilizados num autoclave, Raypa® (Espanha). Selou-se o Erlenmeyer com uma rolha de algodão e por cima cobriu-se com uma folha de alumínio de modo a minimizar uma eventual contaminação do meio, tal como mostram as figuras 3.5 (a) e (b).



(a)



(b)

Figura 3.5 – (a) Erlenmeyer com o meio de cultura preparado com rolha de algodão; (b) Erlenmeyer com o meio de cultura preparado com rolha de algodão e cobertura de alumínio

Embrulharam-se as caixas de Petri em papel de alumínio, tal como mostra as figuras 3.6 (a) e (b).



(a)



(b)

Figura 3.6 – (a) Caixas de Petri envolvidas em alumínio (b) Caixas de Petri envolvidas em alumínio e Erlenmeyer com rolha de algodão e cobertura de alumínio

Colocaram-se as caixas de Petri e o Erlenmeyer num cesto apropriado para levar ao autoclave (figura 3.7).



Figura 3.7 – Cesto para levar ao autoclave

A esterilização das caixas de Petri e do Erlenmeyer, foi efectuada a uma temperatura de 121°C e a uma pressão de 1 atm, no autoclave (figuras 3.8 (a) e (b)).



Figura 3.8 – (a) e (b) Autoclave

As caixas de Petri e o Erlenmeyer foram arrefecidos até ser possível o seu manuseamento. Na figura 3.9 apresenta-se o meio de cultura depois de levado ao autoclave.



Figura 3.9 – Meio de cultura depois de levado ao autoclave

Distribuiu-se o meio de cultura pelas caixas de Petri em condições de assepsia (junto à chama do bico de Bunsen), fazendo uma camada de aproximadamente 5 mm, tal como mostram as figuras 3.10 (a) e (b).

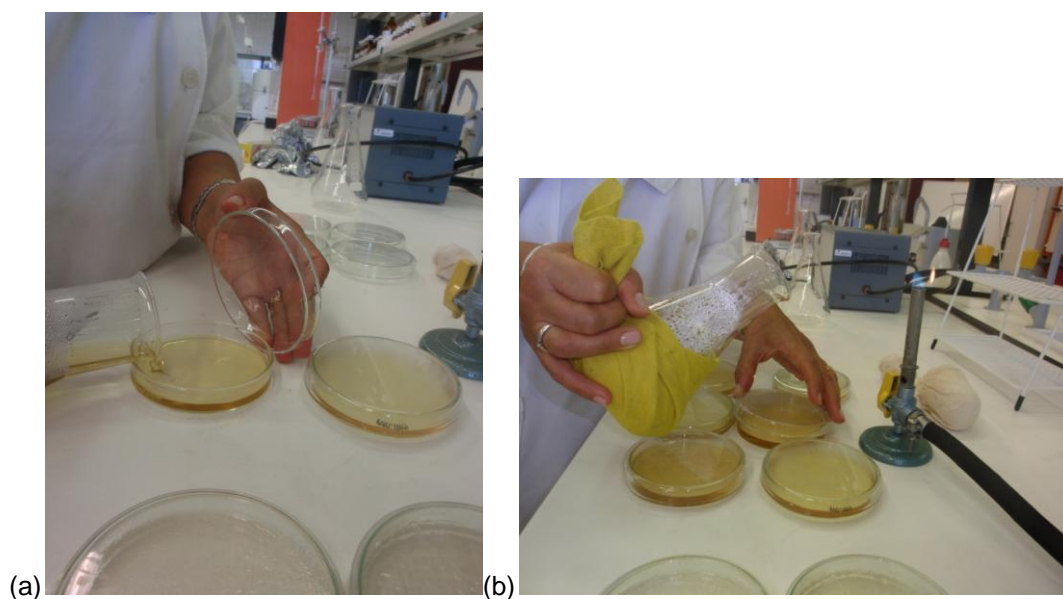


Figura 3.10 – (a) e (b) Distribuição do meio de cultura pelas caixas de Petri

Deixou-se arrefecer e solidificar o meio de cultura para que fosse possível a inversão das caixas de Petri, e com uma caneta de acetato anotou-se o tipo de meio de cultura e a data da sua preparação (figuras 3.11 (a) e (b)).

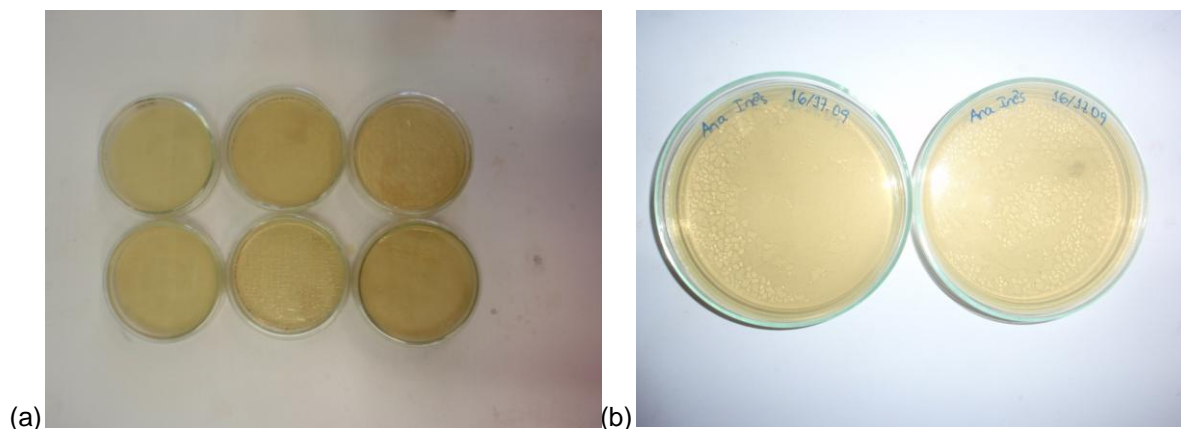


Figura 3.11 – (a) Meio de cultura distribuído pelas caixas de Petri depois de arrefecido e solidificado;
(b) Caixas de Petri invertidas e identificadas

3.3. Obtenção de culturas puras

Passando-se a ansa de repicagem pela chama sempre que necessário, inocularam-se os meios de cultura com a amostra de água residual colhida na ETAR de Santa Cruz, como mostram as figuras 3.12 (a) e (b).

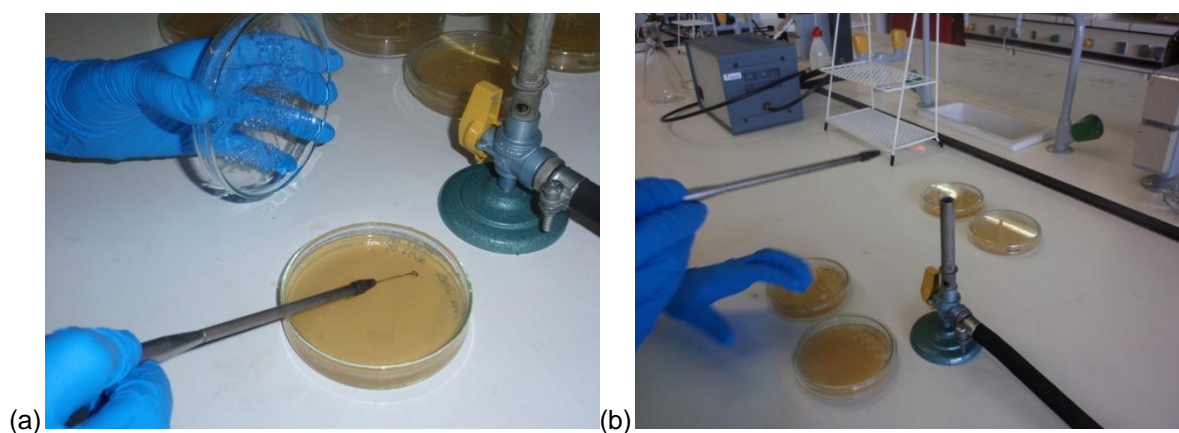


Figura 3.12 – (a) e (b) Inoculação em meio de cultura

Incubaram-se os meios de cultura com as placas invertidas, numa incubadora Raypa® (Espanha), figuras 3.13 (a) e (b), a 37°C durante 48 a 72 horas.

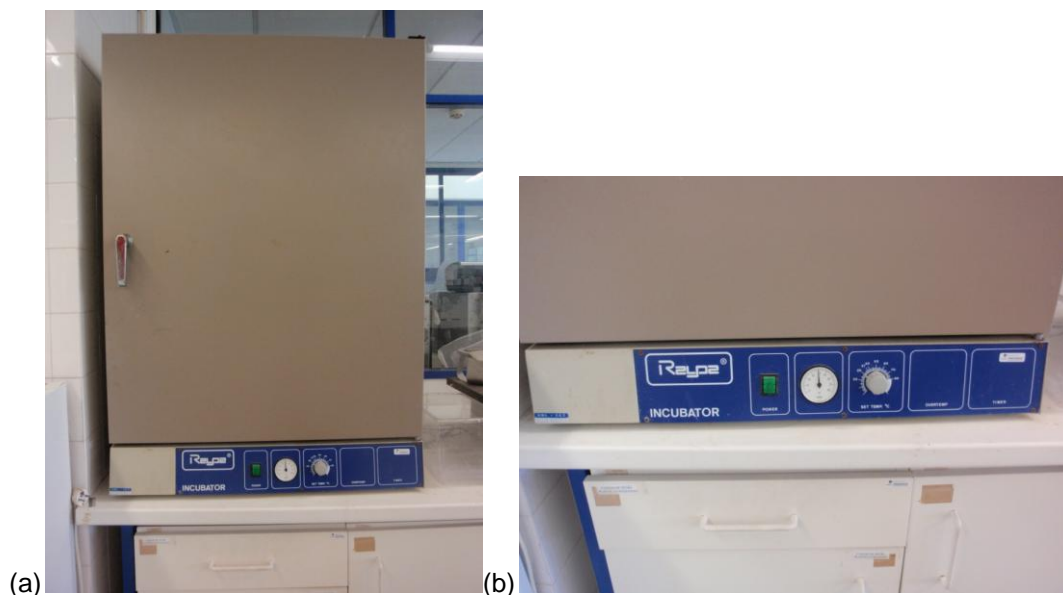


Figura 3.13 – (a) e (b) Incubadora

Nas figuras 3.14 (a) e (b), mostra-se o crescimento bacteriano presente nas placas obtido inicialmente.

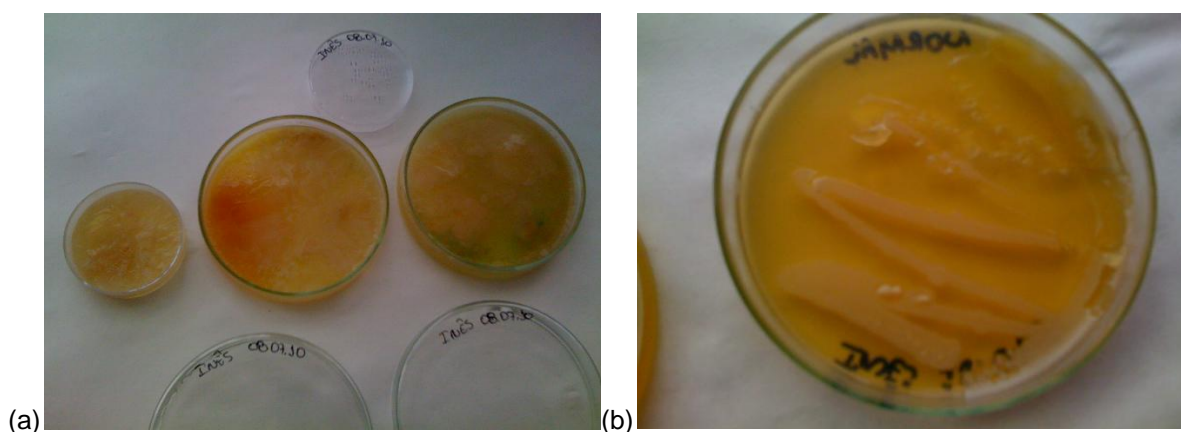


Figura 3.14 – (a) e (b) Culturas de bactérias obtidas inicialmente

Colheu-se uma amostra das colónias de microrganismos presentes nas placas e conservaram-se as amostras em PBS com glicerol (30%) num eppendorf a uma temperatura de -80°C até nova colonização (figuras 3.15 (a) e (b)).

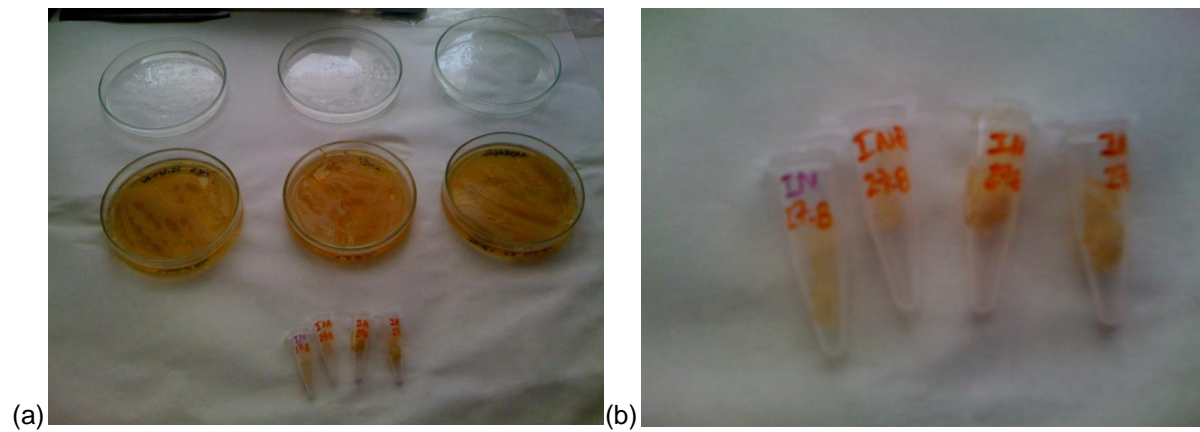


Figura 3.15 – (a) e (b) Eppendorf para conservação da amostra

Para obtenção de culturas mais puras e de forma a ter-se colónias bacterianas frescas para aplicação do método API, descongelaram-se as amostras e homogeneizaram-se com ajuda de um vórtex Top-mix 11118 Fisher Bioblock Scientific (Bélgica), figura 3.16.

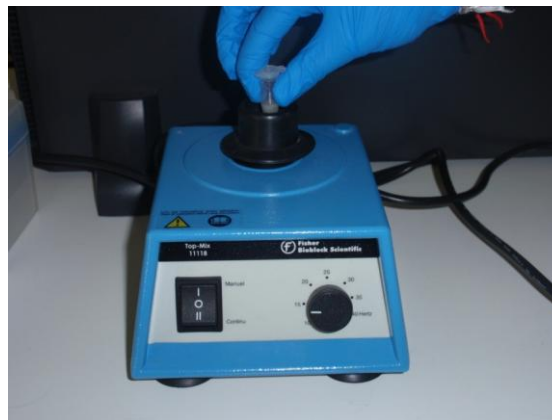


Figura 3.16 – Agitação da amostra no vortex

Passou-se a ansa de repicagem pela chama e retirou-se dos eppendorf um pouco da amostra previamente conservada a -80°C , tal como mostram as figuras 3.17 (a) e (b).

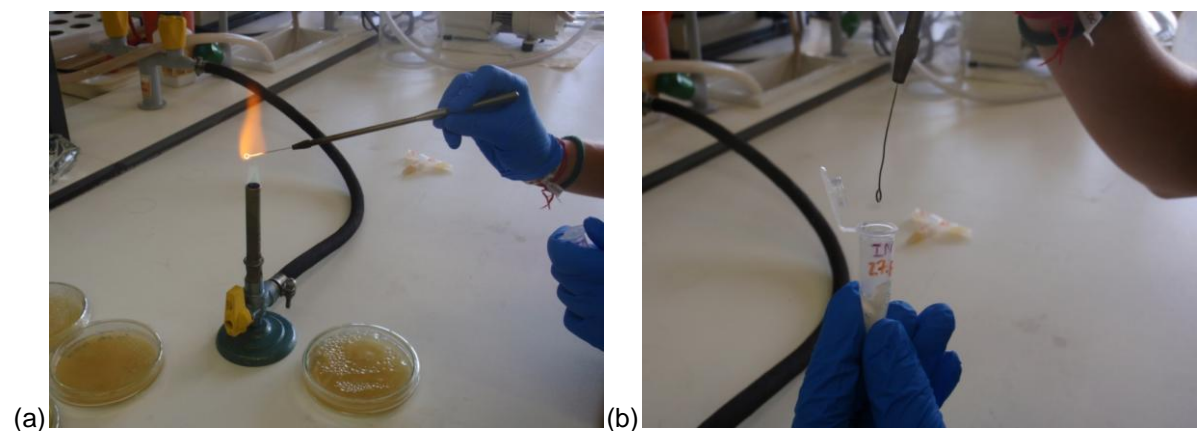


Figura 3.17 – (a) Ansa de repicagem na chama; (b) A retirar do eppendorf um pouco de amostra conservada, com a ansa de repicagem

Por fim, a amostra foi inoculada de novo em meio de cultura, até se obterem culturas mais puras do que as iniciais, conforme já descrito no ponto 3.2 (figuras 3.18 (a) e (b)).

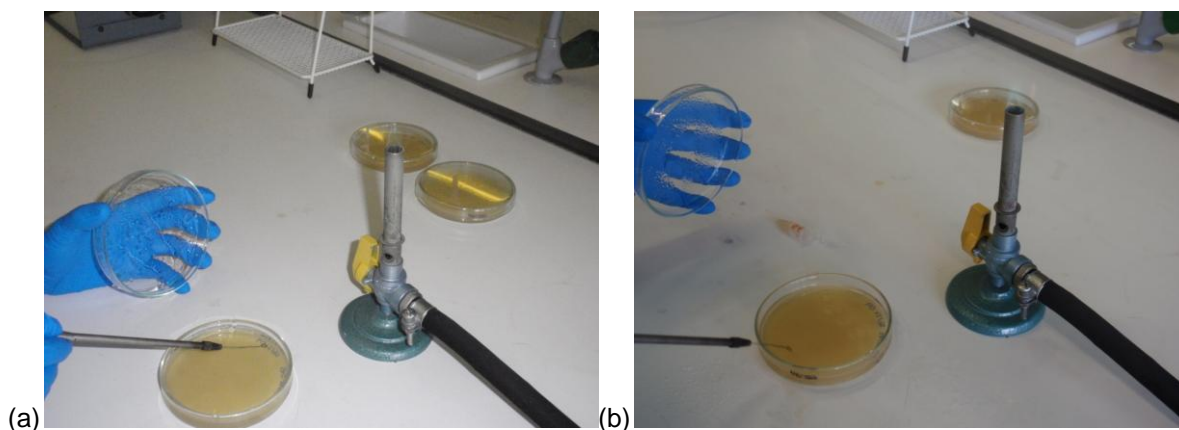


Figura 3.18 – (a) e (b) Re-inoculação

3.4. Observação microscópica e coloração

Inicialmente, para visualizar o aspecto geral, observou-se ao microscópio óptico a amostra bruta recolhida na ETAR, sem recurso a qualquer tipo de coloração. Em seguida, à medida que se iam fazendo re-inoculações em novos meios de cultura, aplicaram-se dois tipos de coloração: coloração com hematoxilina e eosina e coloração de Gram.

Em todas as observações microscópicas foi utilizado o microscópio óptico Leica DMLB (Alemanha), figuras 3.19 (a) e (b).

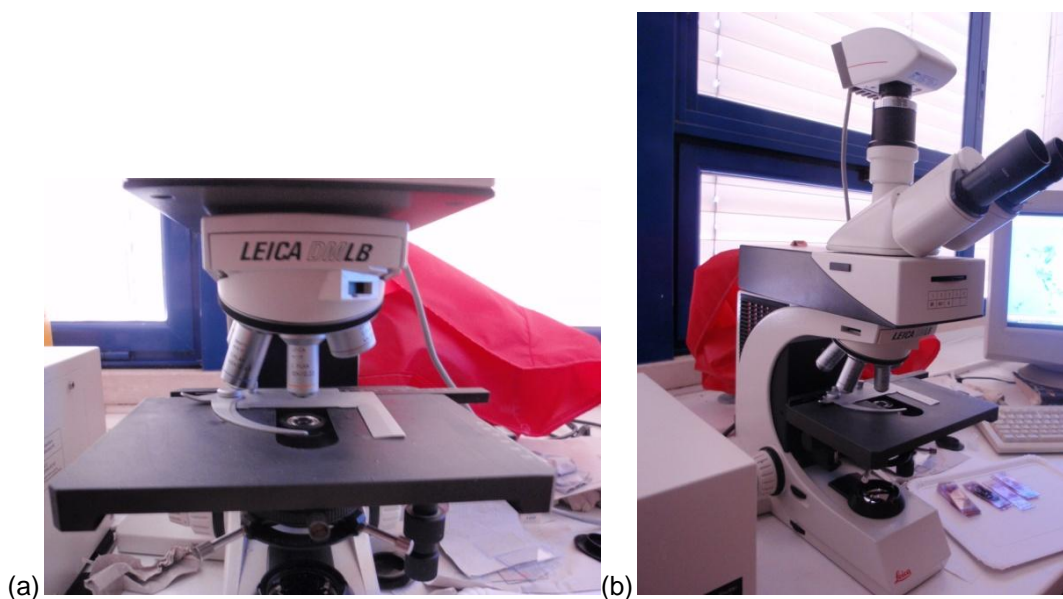


Figura 3.19 – (a) e (b) Microscópio óptico utilizado para examinar as lâminas

3.4.1. Coloração com hematoxilina e eosina

Para se obter uma coloração foi necessário preparar inicialmente os esfregaços das amostras a analisar, conforme se mostra nas figuras 3.20 (a) e (b), isto é, retirou-se uma pequena colônia bacteriana e ressuspendeu-se numa gota de água previamente aplicada na lâmina. Espalhou-se ligeiramente a mistura obtida e deixou-se secar lentamente ao ar.

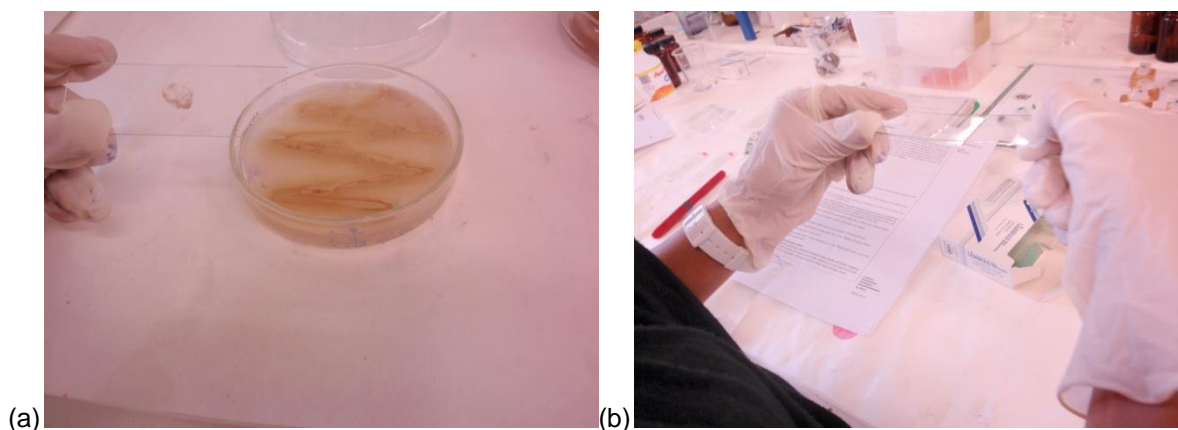


Figura 3.20 – (a) e (b) Preparação dos esfregaços

As lâminas foram posteriormente mergulhadas nos frascos com as soluções de hematoxilina e de eosina que se mostram na figura 3.21.



Figura 3.21 – Solução de hematoxilina à esquerda e solução de eosina à direita

Finalmente, examinaram-se as lâminas ao microscópio óptico (figura 3.19), com uma ampliação de 1000x.

3.4.2. Coloração de Gram

Para a aplicação do método da coloração de Gram, foi utilizado o protocolo segundo Richard Coico (1997). A preparação dos reagentes e soluções utilizados neste método seguiram também o protocolo referido.

Inicialmente foram preparados os esfregaços das amostras a analisar, tal como descrito anteriormente para a coloração com hematoxilina e eosina (figuras 3.20 (a) e (b)).

Seguidamente cobriram-se os esfregaços com violeta de cristal, deixando actuar durante 30 segundos, como se mostra as figuras 3.22 (a) e (b).

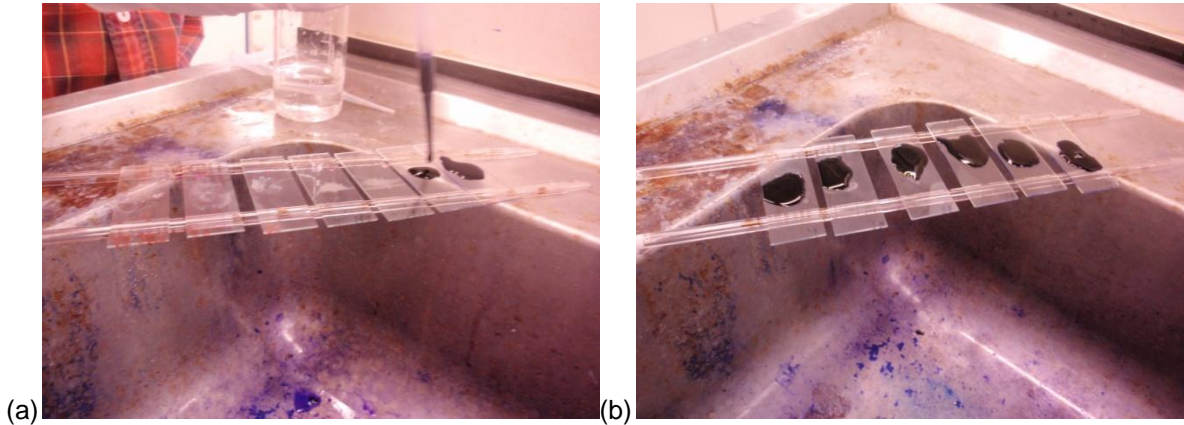


Figura 3.22 – (a) e (b) Coloração com de cristal de violeta

Retirou-se o corante de violeta de cristal, lavando com água durante 5 segundos, figuras 3.23 (a) e (b).

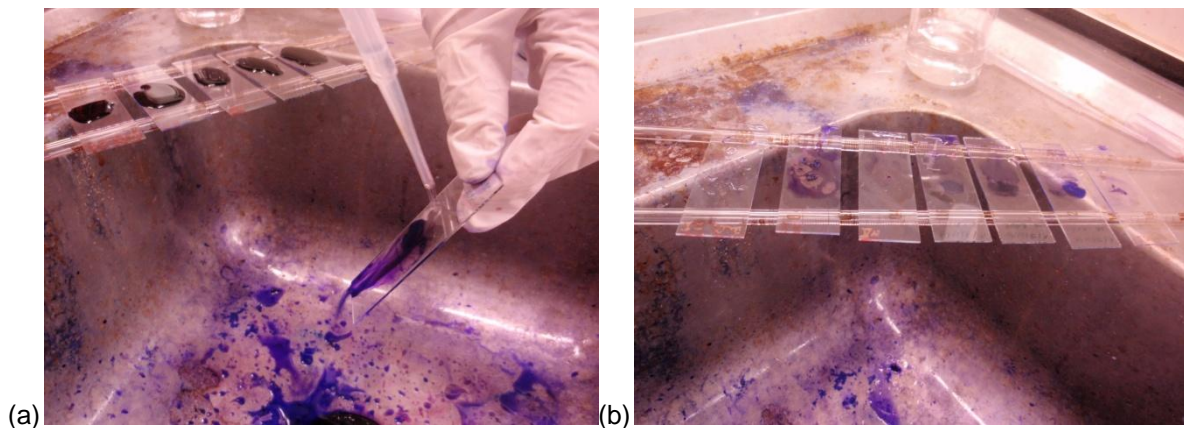


Figura 3.23 – (a) e (b) Remoção do corante de cristal de violeta

Cobriram-se os esfregaços com solução de iodo de Gram durante 1 minuto, lavando-se depois com água tal como no passo anterior, figuras 3.24 (a) e (b).

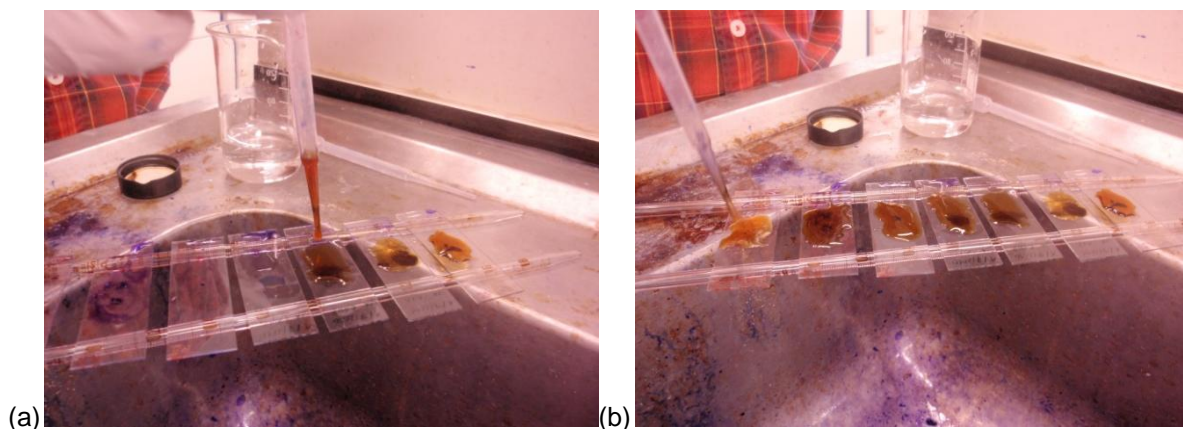


Figura 3.24 – (a) e (b) Aplicação da solução de iodo de Gram

Aplicou-se uma solução de descoloração (mistura de iguais volumes de etanol e acetona a 95%), deixando caí-la lentamente sobre as lâminas ligeiramente inclinadas, permitindo que a solução corra sobre o esfregaço, tal como mostram as figuras 3.25 (a) e (b). Lavou-se depois com água tal como nos passos anteriores.

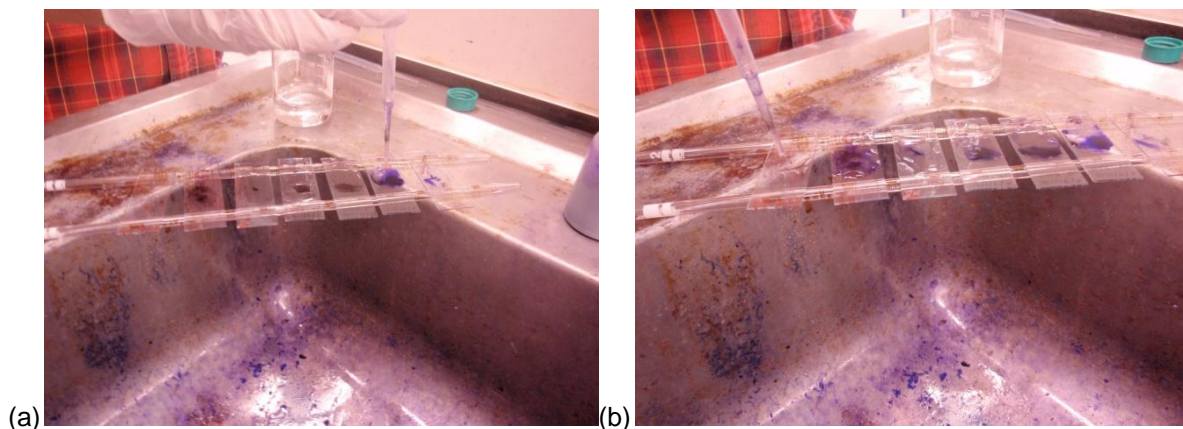


Figura 3.25 – (a) e (b) Aplicação da solução de descoloração

Cobriram-se os esfregaços com um corante de contraste, a safranina, deixando actuar durante 30 segundos, tal como mostram as figuras 3.26 (a) e (b). Em seguida, lavou-se com água tal como nos passos anteriores.

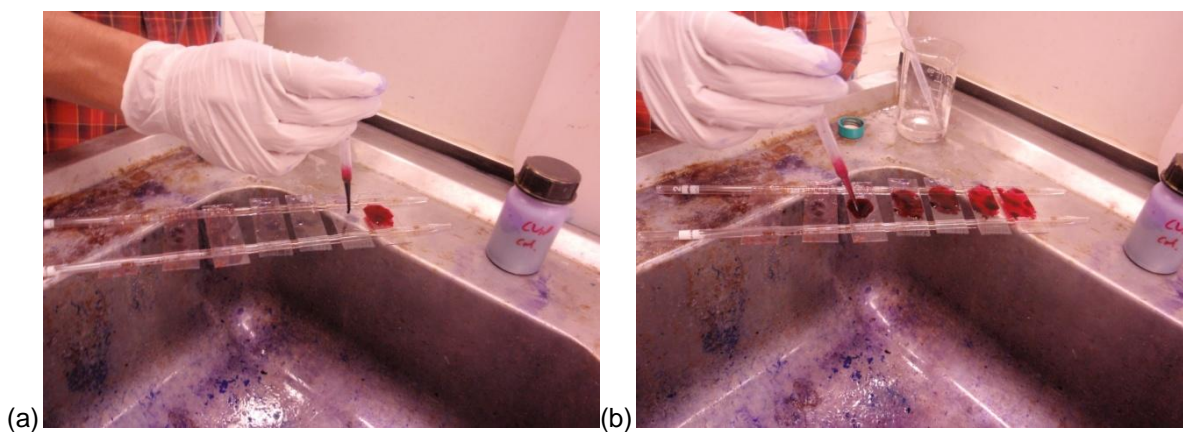


Figura 3.26 – (a) e (b) Coloração com safranina

Por fim, os esfregaços secaram lentamente ao ar, tal como mostra a figura 3.27.

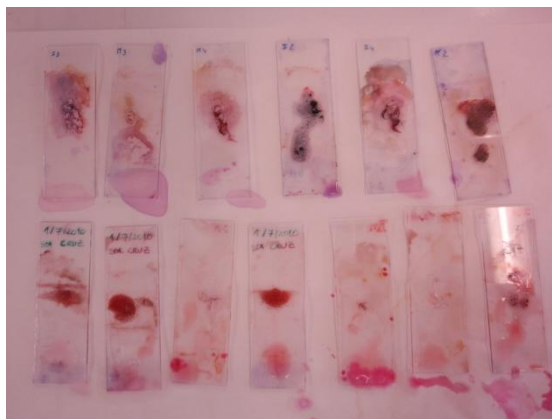


Figura 3.27 – Esfregaços a secar ao ar

Examinaram-se as lâminas sem lamela ao microscópio óptico (figura 3.19 (a) e (b)), sobre óleo de imersão com uma ampliação de 1000x, distinguindo-se as bactérias Gram positivas das Gram negativas.

3.5. API

Os testes API foram realizados de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, a empresa BioMérieux, com a referência 20 100.

Segundo a BioMérieux, este sistema não deve ser utilizado directamente a partir das amostras, devendo os microrganismos a identificar ser primeiramente isolados num meio de cultura adaptado à cultura de *Enterobacteriaceae* e/ou bacilos Gram negativos não fastidiosos segundo as técnicas habituais de bacteriologia, conforme já descrito nos pontos 3.2 e 3.3.

Inicialmente as galerias foram preparadas distribuindo cerca de 5 mL de água destilada nos alvéolos, de forma a criar uma atmosfera húmida, tal como mostram as figuras 3.28 (a) e (b).

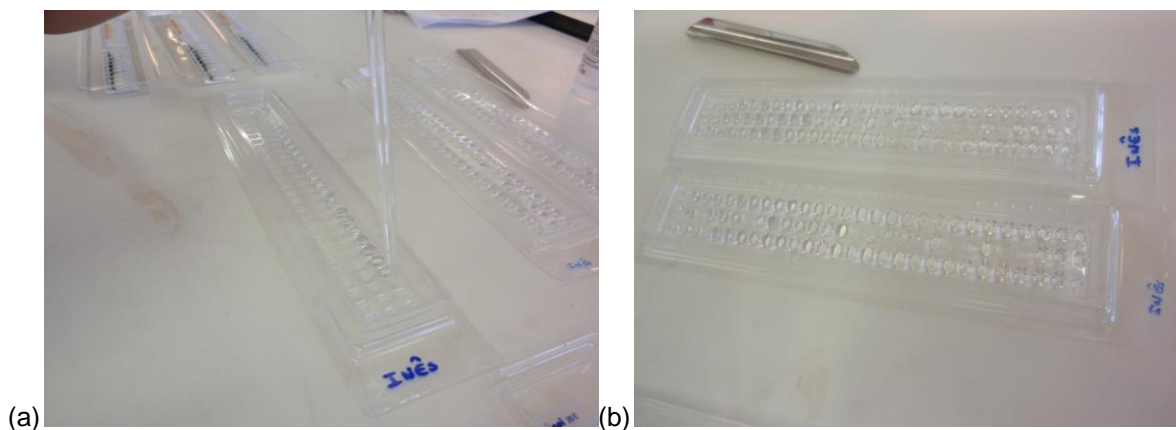


Figura 3.28 – (a) e (b) Distribuição de água destilada nos alvéolos

O passo seguinte consistiu em colocar as galerias nas respectivas caixas de incubação e na preparação de uma solução de NaCl a 85%, tendo-se distribuído pelos tubos de ensaio 5 mL desta solução (figuras 3.29 e 3.30 (a) e (b)).

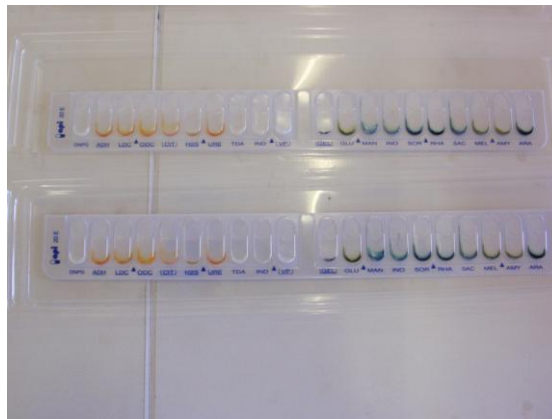


Figura 3.29 – Galerias nas caixas de incubação



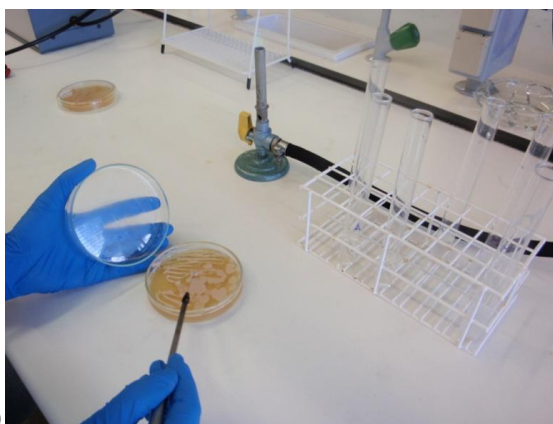
(a)



(b)

Figura 3.30 – (a) e (b) Tubos de ensaio com 5 mL da solução de NaCl

Com a ajuda de uma ansa de repicagem, colheram-se colónias presentes nos meios de cultura, e colocaram-se nos tubos de ensaio, tal como se mostra na figura 3.31 (a) e (b).



(a)



(b)

Figura 3.31 – (a) Colheita da colónia do meio de cultura; (b) Introdução no tubo de ensaio

O conteúdo dos tubos de ensaio foi homogeneizado, com recurso a um vórtex Top-mix 11118 Fisher Bioblock Scientific (Bélgica), figura 3.32 estando assim finalizada a preparação do inóculo.



Figura 3.32 – Vórtex

Depois introduziram-se as suspensões bacterianas nos tubos da galeria, inclinando ligeiramente a caixa de incubação para a frente, tal como mostram as figuras 3.33 (a) e (b). Nos tubos CIT, VP e GEL, para além dos tubos encheram-se também as cúpulas com a suspensão bacteriana.

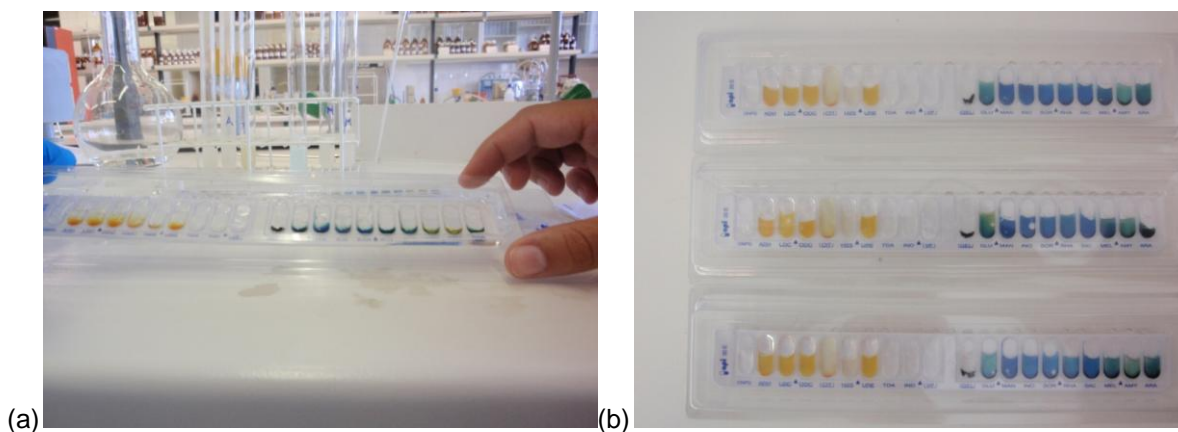


Figura 3.33 – (a) Introdução da suspensão bacteriana nos tubos da galeria; (b) Aspecto das galerias depois de inoculadas

E nos tubos ADH, LDC, ODC, H₂S e URE, para além dos tubos encheram-se as cúpulas com óleo de parafina, de forma a criar um ambiente anaeróbio (figura 3.34 (a)). Fecharam-se as caixas de incubação para incubação durante 24 horas a 37°C (figura 3.34 (b)), numa incubadora Raypa® (Espanha) conforme se mostra nas figuras 3.13 (a) e (b).

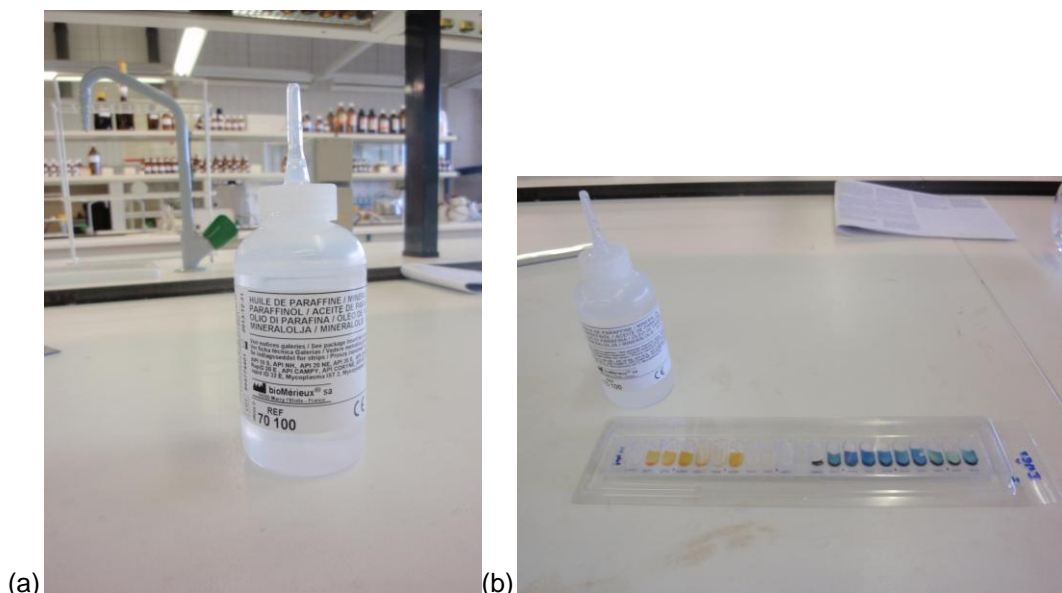


Figura 3.34 – (a) Frasco de óleo de parafina; (b) Caixa de incubação fechada

Nas figuras 3.35 (a) e (b) mostra-se o aspecto das galerias depois de 24 horas de incubação.

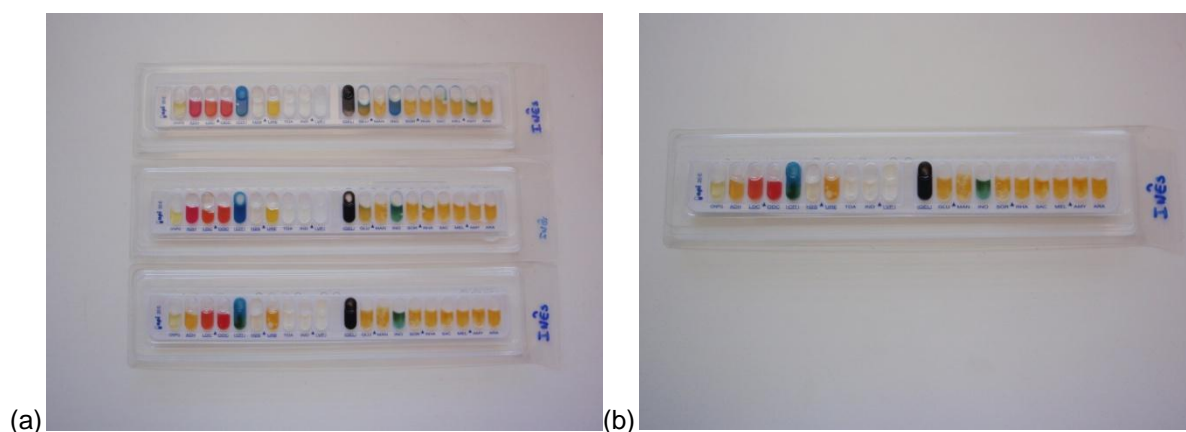


Figura 3.35 – (a) e (b) Aspecto das galerias depois de 24 horas de incubação

Após verificar que para qualquer uma das galerias, o resultado de três ou mais testes era positivo, adicionaram-se os reagentes nos tubos que necessitavam a adição destes. Assim:

- adicionou-se uma gota do reagente TDA nos tubos respectivos ao teste TDA (Tryptofano DesAminase);
- adicionou-se uma gota do reagente VP1 e uma gota do reagente VP2 nos tubos respectivos ao teste VP (Produção de acetoína) e esperou-se pelo menos dez minutos;
- por último (dado que esta reacção liberta gases que podem alterar a interpretação de outros testes da galeria) adicionou-se uma gota do reagente JAMES nos tubos respectivos ao teste IND (Produção de INDol).

Por fim, para além destes testes, efectuaram-se alguns dos testes complementares, nomeadamente, o da redução dos nitratos em nitritos (NO_2) e o da redução dos nitritos a azoto elementar (N_2):

- adicionou-se uma gota do reagente NT1 e uma gota do reagente NT2 no tubo respectivo ao teste GLU (fermentação / oxidação da GLUcose) e esperou-se entre 2 a 5 minutos. Como todos os resultados do teste NO_2 deram positivos (cor vermelha) não se adicionou em nenhuma das galerias o reagente Zn (zinco), tendo-se por isso considerado em todos os casos o teste N_2 negativo.

Nas figuras 3.36 (a) mostram-se os reagentes utilizados nos testes que necessitavam a sua adição, e (b) os reagentes utilizados nos testes complementares.

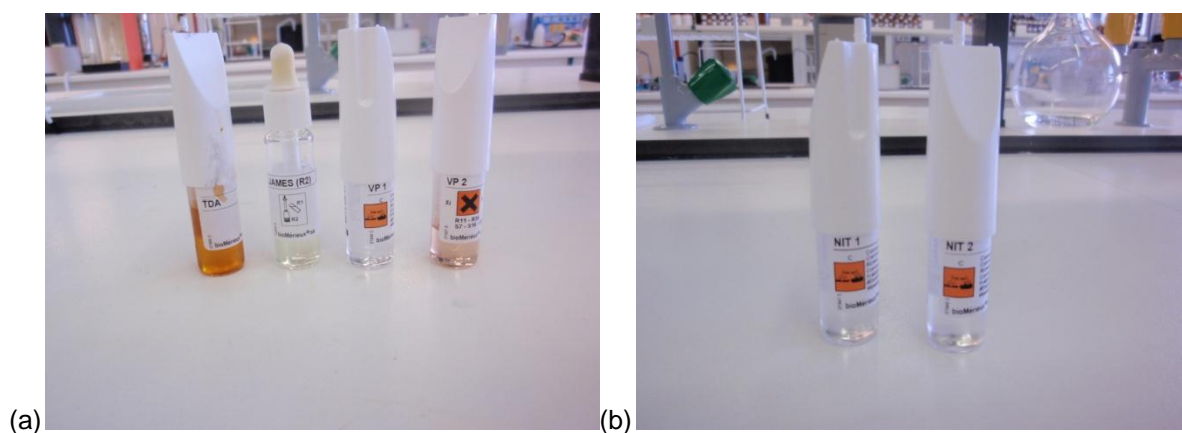


Figura 3.36 – (a) Reagentes utilizados nos testes que necessitavam a adição destes; (b) Reagentes utilizados nos testes complementares

Os microrganismos desempenham as suas diversas actividades bioquímicas utilizando nutrientes obtidos a partir do ambiente que os rodeia, neste caso a partir de meios de cultura. Essas reacções que ocorrem dentro ou fora dos microrganismos são catalisadas por enzimas. É possível observar a capacidade dos microrganismos para utilizarem enzimas para degradar hidratos de carbono, lípidos, proteínas e aminoácidos, cuja metabolização origina produtos finais, e cuja detecção desses produtos finais pode ajudar na caracterização e identificação dos microrganismos (Faculdade de Medicina da Universidade do Porto). Reacções deste tipo são produzidas nas galerias API 20 E, durante o período de incubação e após a aplicação de alguns reagentes. Na figura 3.37, mostra-se para cada teste o aspecto das galerias após a aplicação dos reagentes, nos tubos que necessitavam a sua adição, e após os testes complementares NO_2 e N_2 .



Figura 3.37 – Aspecto das galerias após a aplicação dos reagentes necessários, e após os testes complementares NO_2 e N_2

A leitura das reacções efectuou-se consultando o Quadro de Leitura (BioMérieux), e anotaram-se os resultados em fichas de resultados semelhantes à que se encontra na 3.38. A identificação das espécies é feita através de um perfil numérico, com 7 ou 9 algarismos. Na ficha de resultados, os testes são separados em grupos de três, cada um com um valor 1, 2 ou 4. Cada algarismo do perfil numérico foi obtido pela soma dos respectivos valores (1, 2 ou 4) dos testes que foram positivos, dentro de cada grupo.

 A BioMérieux api 20 E result card. It features a grid of 20 circles representing test results, each with a number (1, 2, or 4) above it. The tests are labeled: TRP, ADH, LDC, GEL, LIT, NIT, URE, TDA, IND, LYS, GEL, GLU, MAN, INO, SOH, RHA, SAC, MEL, AMY, AHA, OX, NO₂, N₂, MOB, MUG, OF-1, OF-2. Below the grid, there are sections for 'Autres tests / Other tests / Andere Tests', 'Ident. / Identification', and 'Origin / Source / Herkunft / Origen / Origem / Tipokörs / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie'.

Figura 3.38 – Ficha de resultados

A identificação da espécie propriamente dita foi realizada através da descodificação do perfil numérico, a partir dos programas de bases de dados: apiweb da BioMérieux e ABIS online (http://www.tgw1916.net/bacteria_logare.html).

3.6. MALDI-TOF MS

Para as análises de MALDI-TOF MS, foram utilizados os protocolos segundo Rial-Otero, (2007) e Shevchenko *et al* (2006). A preparação das soluções utilizadas neste método seguiu também as indicações dos mesmos protocolos.

3.6.1. Extracção das proteínas

Colheu-se uma amostra da cultura de bactérias e ressuspendeu-se em 1 mL de tampão de lise (PBS). Em seguida a amostra foi ultrasonificada utilizando uma sonda de ultra sons, UP 100 HIELSCHER (*Alemanha*) (figuras 3.39 (a) e (b)) a 35 kHz num goblé com gelo durante 3 × 10 segundos, permitindo que as proteínas desnaturassem através da formação de uma espuma, estando a lise completa quando a suspensão bacteriana inicialmente turva se tornar translúcida.



Figura 3.39 – (a) e (b) Sonda de ultra sons

Centrifugou-se a amostra numa centrífuga (Eppendorf) durante 5 minutos, a uma rotação de 13 000 rpm e a uma temperatura de 4°C. Separaram-se as proteínas solúveis (sobrenadante) das insolúveis (*pellet*), tendo-se recolhido o sobrenadante para posterior aplicação no gel.

Ressuspendeu-se novamente o *pellet* em 1 mL de tampão de lise PBS e guardou-se para também posterior aplicação no gel.

3.6.2. Preparação do gel SDS – poliacrilamida

Após a lavagem das placas de vidro com etanol e água ultra-pura, procedeu-se à respectiva montagem, conforme se mostra na figura 3.40.



Figura 3.40 – Placas utilizadas para fazer o gel

Introduziu-se a solução de *running gel* (solução I) no espaço entre as placas e adicionou-se butanol. Esperou-se entre 15 a 30 minutos até que a reacção de polimerização tivesse terminado.

Removeu-se o butanol e a água formada durante a reacção de polimerização e adicionou-se a solução *staining gel* (solução II) colocando-se o pente desejado entre os espaços. Depois permitiu-se que o *staining gel* polimerizasse durante 15 a 30 minutos.

Finalmente o pente foi removido cuidadosamente e lavaram-se os poços tendo-se finalizado a preparação do gel.

3.6.3. Electroforese

Para realização do processo de electroforese, adicionou-se uma amostra tampão (com azul de bromofenol) à mistura de proteínas para que esta corasse (5 μ L da amostra de proteínas + 5 μ L de solução tampão). A mistura de proteínas padronizada que se utilizou na electroforese foi preparada do mesmo modo.

Desnaturaram-se as proteínas em água a ferver, numa placa de aquecimento (Tehcnica Rotamix SHP-10) (figuras 3.41 (a) e (b)) durante 3 a 5 minutos.

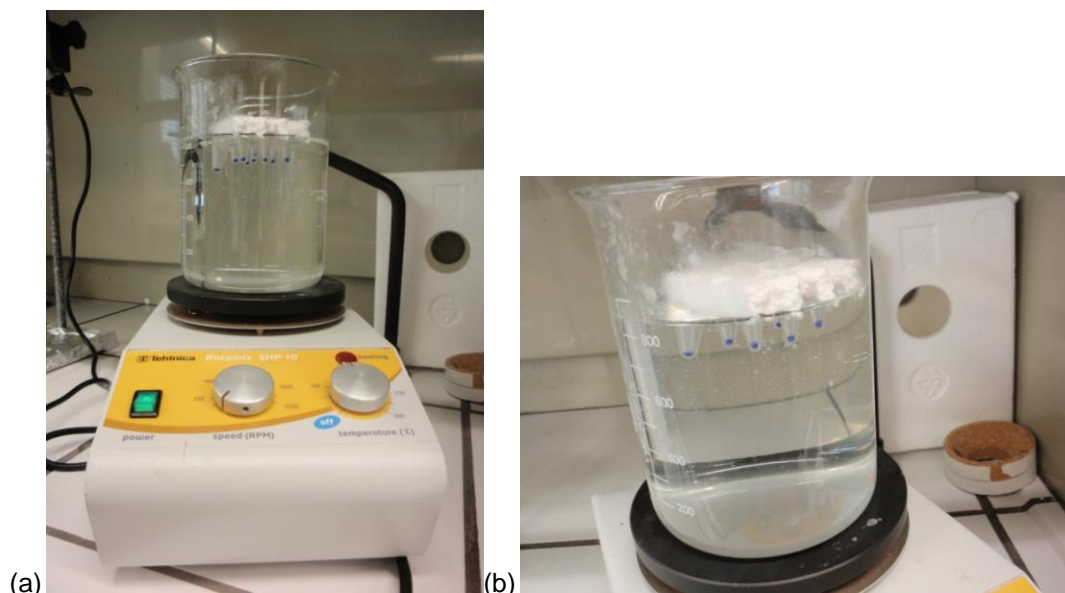


Figura 3.41 – (a) Placa de aquecimento; (b) Proteínas a desnaturar na placa de aquecimento

Colocou-se o dispositivo *gel cassette sandwich* no conjunto de eléctrodos. Depois de todos os componentes para a electroforese estarem na posição correcta, encheu-se a câmara interna e o mini tanque com a solução *running buffer*. Seguidamente, adicionou-se também até 1/3 da capacidade do mini tanque a mesma solução de *running buffer*, conforme se mostra nas figuras 3.42 (a) e (b).

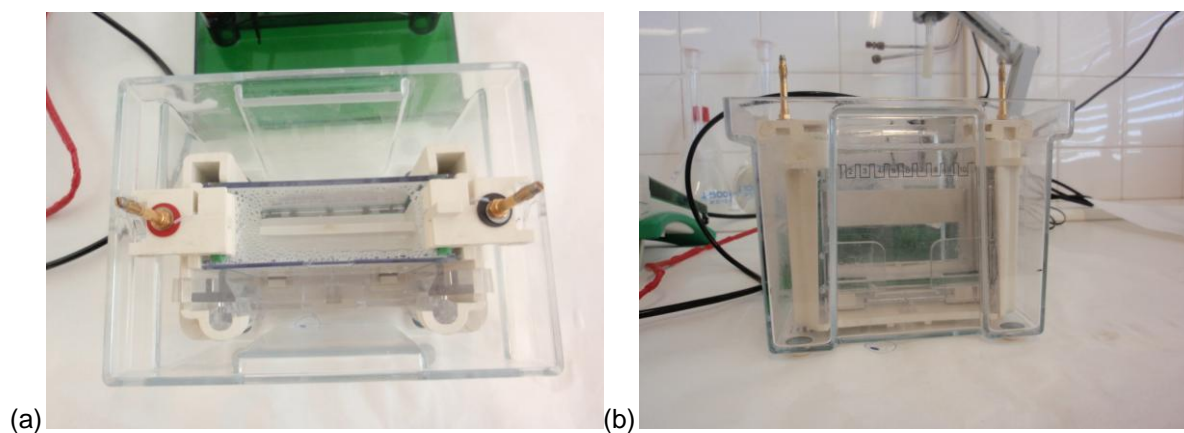


Figura 3.42 – (a) e (b) Tina com câmara interna para electroforese

Carregaram-se com 10 μL de amostra cada um dos poços e a mistura de proteínas padronizada, lentamente com uma micro-pipeta, conforme se mostra nas figuras 3.43 (a) e (b).

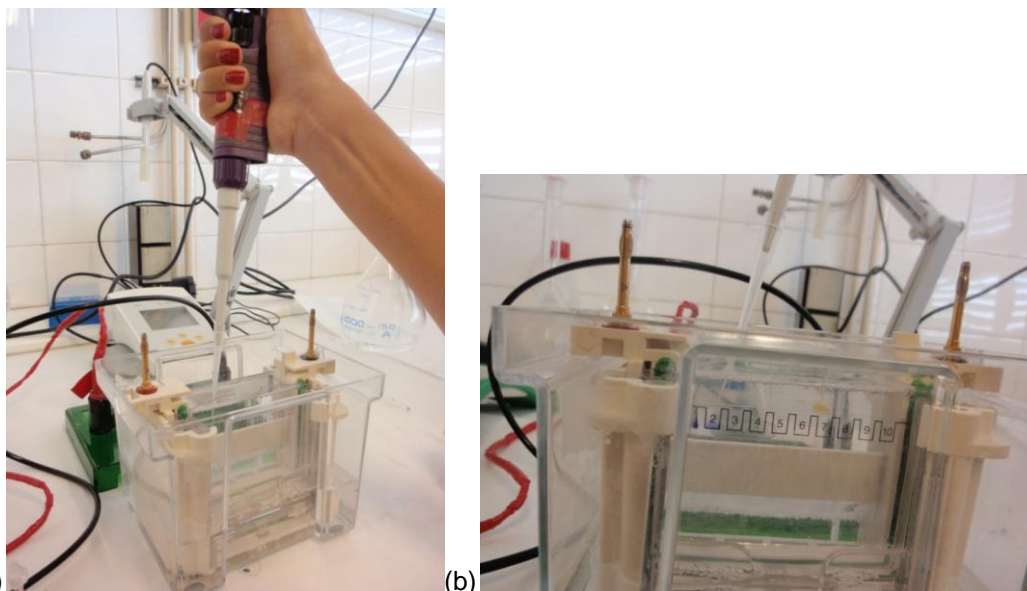


Figura 3.43 – (a) e (b) A carregar cada um dos poços com as amostras e a mistura de proteínas padronizada

Colocou-se a tampa sobre o mini tanque, e certificou-se que os cabos eléctricos estavam bem ligados.

Programou-se a fonte (Bio-Rad, EUA) para 120 V constante, 400 mA e para 70 minutos, tendo-se dado depois início à electroforese (figuras 3.44 (a) e (b)).

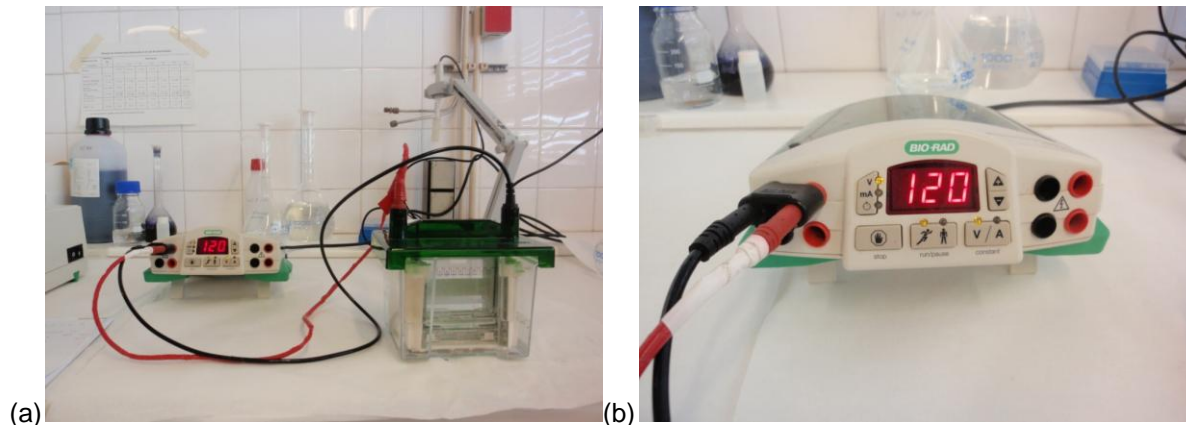


Figura 3.44 – (a) e (b) Mini tanque fechado com os cabos eléctricos bem ligados e fonte de alimentação

Depois da electroforese estar completa, desligou-se a alimentação e os cabos eléctricos. Retirou-se cuidadosamente a tampa do tanque e o conjunto da câmara interna.

Separaram-se cuidadosamente as duas placas da *gel cassette sandwich*, e depois removeu-se o gel, tendo este sido lavado com água ultra pura.

Deixou-se o gel numa solução de coloração *coomassie blue R-250* durante uma hora.

Removeu-se depois a solução de coloração e adicionou-se a solução de descoloração. O gel foi mantido nesta última solução até à sua análise, tal como mostra a figura 3.45.

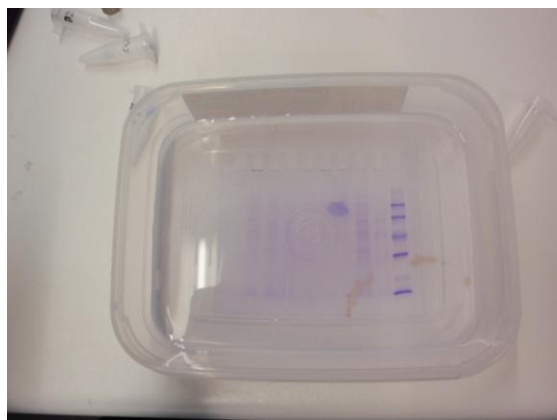


Figura 3.45 – Gel na solução de descoloração

3.6.4. Digestão das proteínas no gel

Colocou-se a bandas da proteína seleccionada do gel em eppendorf, cortada previamente com o auxílio de um bisturi.

Adicionou-se 100 μ L de ambic 12,5 mM / 50% ACN e sonicou-se num banho de ultra sons, Elma (Alemanha) (figuras 3.46 (a) e (b)) durante 5 minutos, a 35 kHz e 60% de amplitude.

Removeu-se a água e adicionou-se 100 μ L de acetonitrilo e sonicou-se novamente no banho de ultra sons durante 5 minutos, a 35 kHz e 60% de amplitude, tendo-se obtido depois dos passos de lavagem, peças de gel rígidas e coradas de branco.

Removeu-se o acetonitrilo e adicionou-se 40 μ L de DDT 10 mM e sonicou-se depois no mesmo banho de ultra sons à temperatura ambiente durante 5 minutos, a 35 kHz e 60% de amplitude.

Removeu-se o DDT e adicionou-se 30 μ L de IAA 100 mM e sonicou-se depois no mesmo banho de ultra sons à temperatura ambiente durante 5 minutos, a 35 kHz e 60% de amplitude.

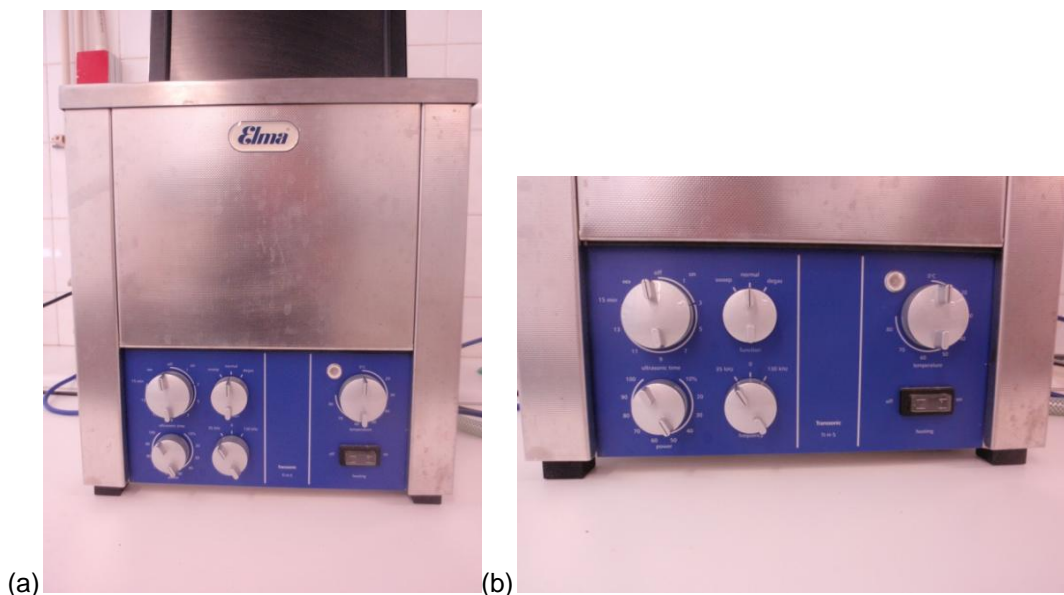


Figura 3.46 – (a) e (b) Banho de ultra sons

Repetiu-se o procedimento de lavagem com ambic / acetonitrilo e acetonitrilo e secou-se numa centrífuga de vácuo.

Adicionou-se 15 μL de tripsina a cada amostra e depois 10 μL de ambic 12,5 mM / acetonitrilo 10%. Deu-se início à digestão enzimática no sonoreactor, durante 2 minutos e 50% de amplitude.

Adicionou-se 20 μL de ácido fórmico a 5% e colheu-se o sobrenadante para novos eppendorf.

Às restantes peças de gel adicionou-se 25 μL de acetonitrilo a 50% e ácido trifluoroacético a 0,1%. Sonicou-se no sonoreactor, durante 2 minutos e 50% de amplitude. Colheu-se o sobrenadante e repetiu-se o passo de extracção mais uma vez.

Secaram-se as proteínas digeridas numa centrífuga de vácuo.

Ressuspenderam-se as proteínas digeridas em 10 μL de ácido fórmico a 0,3% e utilizou-se mais uma vez o banho de ultra sons, Elma (Alemanha) durante 5 minutos, a 35 kHz e 60% de amplitude.

Adicionou-se a solução matriz (α -CHCA) na razão 1:1 e colocou-se 1 μL na placa de MALDI, conforme se mostra na figura 3.47 (a) e (b).

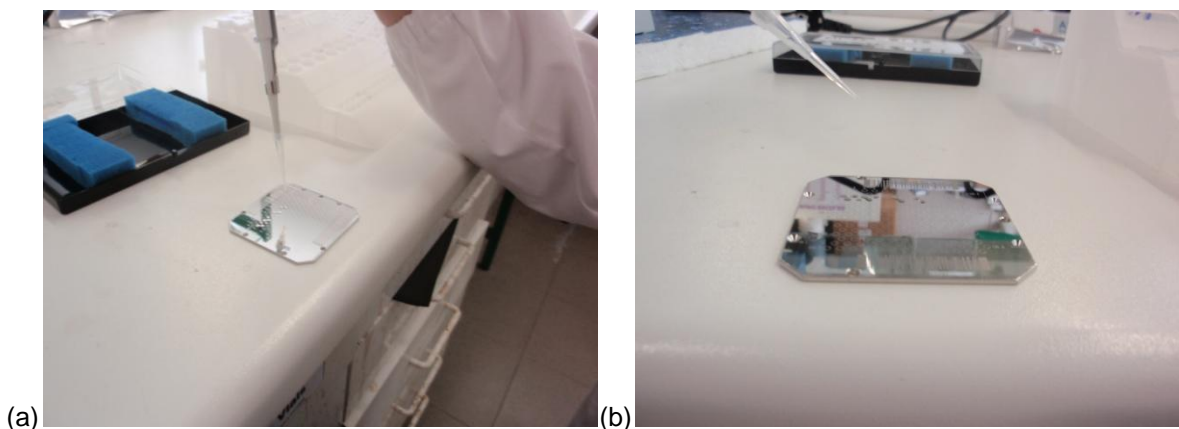


Figura 3.47 – (a) e (b) Placa de MALDI

As análises de MALDI-TOF foram realizadas na Universidade de Vigo, no Campus de Ourense, com recurso ao equipamento Bruker (EUA).

A MALDI-TOF-TOF-MS da BRUKER (EUA) equipado com um laser de azoto (337 nm) foi utilizado na obtenção dos espectros de massa de PMF. As medições foram efectuadas em modo reflector positivo, com uma voltagem de aceleração de 20KV, 75.1% de “grid voltage”, e um tempo de delay de 100 ns. Foram efectuadas calibrações externas com os picos monoisotópicos da Bradikinina, Angiotensina II, P14R e fragmentos peptídicos de ACTH (m/z : 757.3997, 1046.5423, 1533.8582 e 2465.1989, respectivamente). A massa espectral baseou-se na média de 500 laser shots. Os resultados obtidos PMF foram analisados com auxílio do programa de pesquisa MASCOT (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) com os seguintes parâmetros: (i) SwissProt. Database; (ii) NCBI Database; (iii) taxonomy Bacteria; (iv) one missed cleavage; (v) fixed modifications: carbamidomethylation (C); (vi) variable modifications: oxidation (M); (vii) peptide tolerance up to 150 ppm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Observação microscópica

Inicialmente, para observação do aspecto geral, observou-se ao microscópio óptico a amostra recolhida na ETAR, sem coloração, e anteriormente ao cultivo em meio de cultura apropriado. Tal como se mostra nas figuras 4.1 (a) e (b), a amostra de lama inicial possui diversas espécies de microrganismos, onde é possível distinguir a presença de alguns filamentos e agregados.

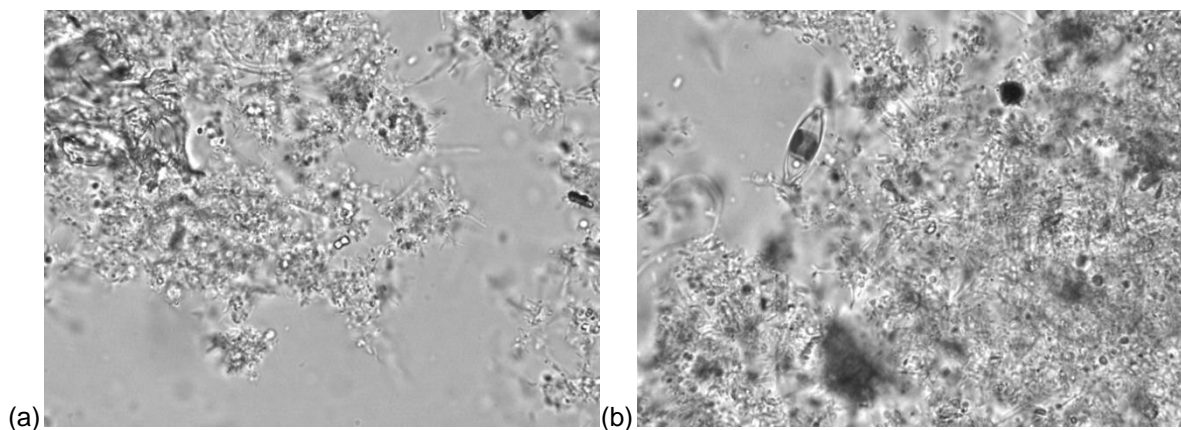


Figura 4.1 – (a) e (b) Aspecto geral da lama sem coloração (ampliação 1000x)

4.1.1. Coloração com hematoxilina e eosina

Após a inoculação e crescimento em meio de cultura e posterior observação através de microscopia óptica com a aplicação destes corantes, foi possível verificar que a amostra ainda apresentava pelo menos dois tipos de microrganismos. Tal como se mostra nas figuras 4.2 (a) e (b), morfologicamente os microrganismos observados apresentam características distintas entre si, como por exemplo dimensão e forma.

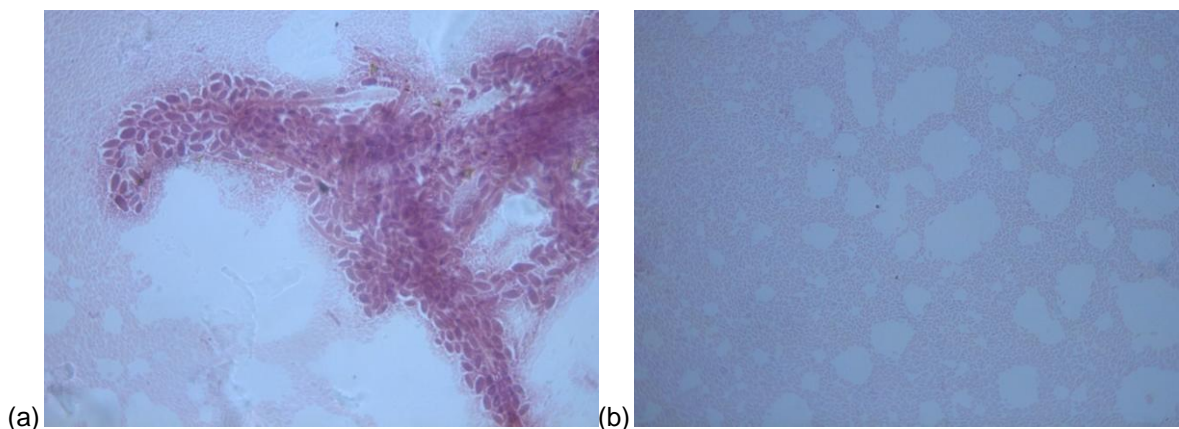


Figura 4.2 – Microrganismos visíveis com aplicação da coloração com hematoxilina e eosina (ampliação 1000x)

4.1.2. Coloração de Gram

Na figura 4.3 é possível observar o aspecto geral da lama inicial, com a aplicação da coloração de Gram, antes do cultivo em meio de cultura apropriado. Da mesma forma do que inicialmente sem coloração, observam-se várias espécies de microrganismos, distinguindo-se alguns agregados e filamentos. Verifica-se também que a maioria dos microrganismos presentes são Gram negativos.

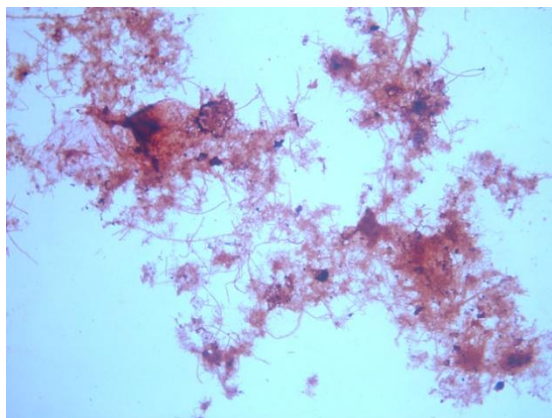


Figura 4.3 – Aspecto geral da lama inicial com a aplicação da coloração de Gram (ampliação 400x)

Após sucessivas repicagens isolaram-se diferentes espécies de microrganismos que foram posteriormente utilizadas para identificação através dos métodos API e MALDI-TOF MS (figuras 4.4. (a), (b) e (c)). Nas figuras 4.4 (a) e (b) mostra-se que os microrganismos são na sua maioria Gram positivos, devido à sua coloração azul/preta. No entanto na figura 4.4 (c) os microrganismos estão corados de vermelho, sendo por isso considerados Gram negativos. Para além disso, os microrganismos presentes na figura 4.4 (b) apresentam uma forma diferente, do tipo cocos, em relação aos das figuras 4.4 (a) e (c), do tipo bacilos.

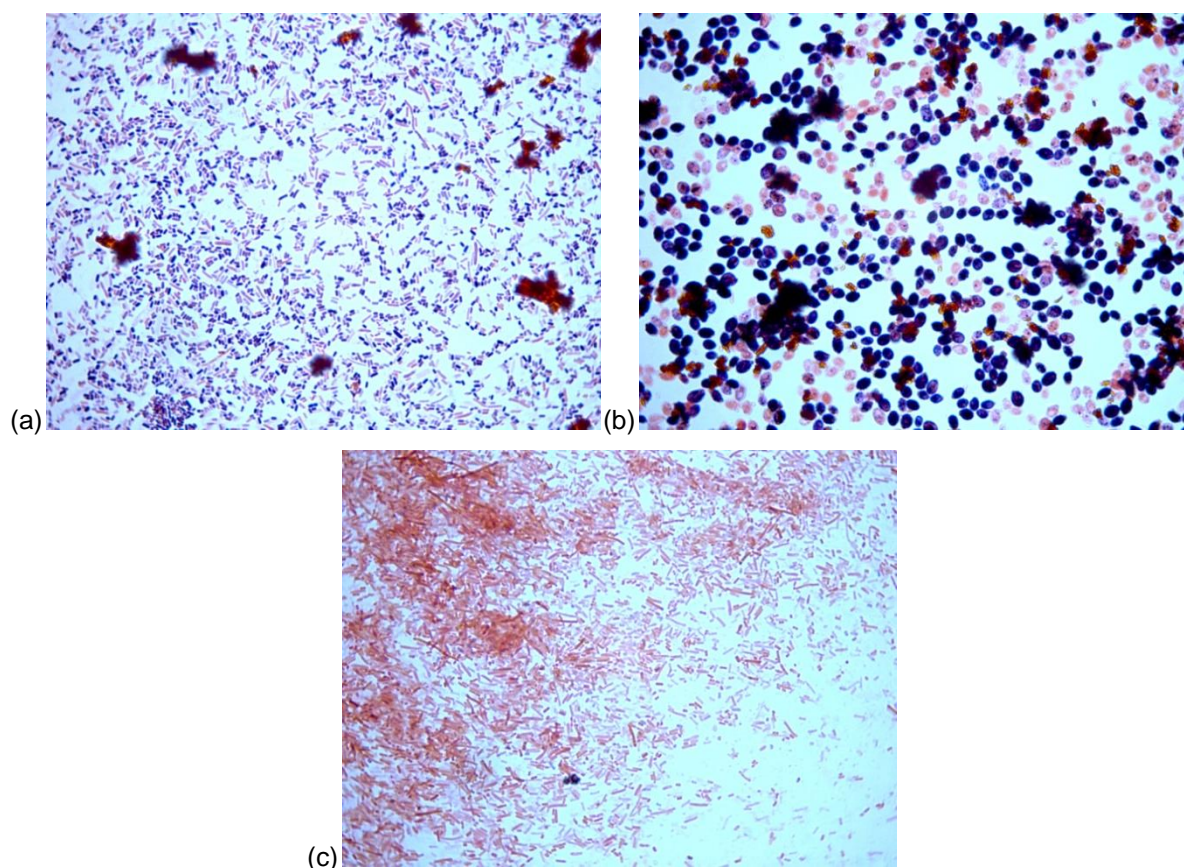


Figura 4.4 – Microrganismos visíveis com aplicação da coloração de Gram: (a) Microrganismos tipo bacilos maioritariamente Gram positivos (ampliação 1000x); (b) Microrganismos tipo cocos maioritariamente Gram positivos (ampliação 1000x); (c) Microrganismos tipo bacilos Gram negativos (ampliação 1000x)

Tal como se pôde verificar a partir da observação microscópica, pela aplicação dos dois tipos de coloração (com hematoxilina e eosina, e Gram), não foi possível dentro do tempo da actividade experimental, obter culturas puras dos organismos utilizados para identificar posteriormente através dos métodos de API e MALDI-TOF MS.

4.2. API

A leitura das reacções foi realizada a partir da observação da viragem de cor dos microtúbulos e decodificadas com ajuda do Quadro de Leitura da BioMérieux. Na figura 4.5 mostra-se o aspecto das galerias, após o período de incubação e a aplicação de alguns reagentes.



Figura 4.5 – Aspecto das galerias após o período de incubação e a aplicação de alguns reagentes

Nas figuras 4.6, 4.7 e 4.8 mostram-se as fichas de resultados com os valores obtidos para as amostras 1, 2 e 3, respectivamente, através da leitura das reacções com ajuda do Quadro de Leitura.

Figura 4.6 – Ficha de resultados nº1 para a amostra 1

api® 20 E

REF.: Inês / 2

Origine / Source / Herkunft /
 Origin / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4

1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Tauximolig. :

Figura 4.7 – Ficha de resultados nº2 para a amostra 2

api® 20 E

REF.: Inês / 3

Origine / Source / Herkunft /
 Origin / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4

1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Tauximolig. :

Figura 4.8 – Ficha de resultados nº3 para a amostra 3

A identificação dos microrganismos foi realizada através da descodificação do perfil numérico, com o auxílio dos programas de bases de dados: apiweb e ABIS online.

Segundo o apiweb, da BioMérieux, identificou-se presumivelmente com uma probabilidade de cerca de 99%, organismos do género *Serratia*, e possivelmente das espécies *Serratia odorifera*, *Serratia marcescens* e/ou *Serratia liquefaciens*.

Segundo o ABIS online os resultados obtidos em cada um dos testes, 1, 2 e 3, respectivamente, encontram-se nas tabelas 4.1, 4. 2 e 4.3.

Tabela 4.1 – Resultados da amostra 1 segundo o programa ABIS online

Amostra 1	
Espécie	% de probabilidade
<i>Kluyvera ascorbata</i>	83
<i>Serratia odorifera</i>	83
<i>Serratia grimesii</i>	82
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	78

Tabela 4.2 – Resultados da amostra 2 segundo o programa ABIS online

Amostra 2	
Espécie	% de probabilidade
<i>Serratia odorifera</i>	93
<i>Serratia proteamaculans</i>	93
<i>Kluyvera ascorbata</i>	88
<i>Serratia liquefaciens</i>	88

Tabela 4.3 – Resultados da amostra 3 segundo o programa ABIS online

Amostra 3	
Espécie	% de probabilidade
<i>Kluyvera ascorbata</i>	88
<i>Serratia odorifera</i>	88
<i>Serratia grimesii</i>	88
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	83

Segundo estes dois programas de identificação, o género *Serratia* foi identificado com uma percentagem de probabilidade bastante elevada, estando, por isso, de alguma forma estes dois programas em concordância. Para além do género *Serratia*, o programa ABIS online também identificou o género *Kluyvera* como possível, e igualmente com uma probabilidade bastante elevada.

O género *Serratia* diz respeito a bactérias Gram negativas da família das *Enterobacteriaceae*, facultativamente anaeróbias e em forma de bastonete, que ocorrem no ambiente natural (solo, água e superfícies de plantas) ou como patogénicos oportunistas para o homem. Este género é considerado actualmente como emergente, causando vários tipos de infecção em todo o mundo, principalmente em hospitais, estando a ser isolada com frequência em estudos clínicos. Os organismos deste género produzem as enzimas lipase,

gelatinase e Dnase que são factores importantes da sua patogenecidade (Biblioteca Virtual em Saúde, 2010; Menezes *et al.* 2004; Vasconcelos *et al.*, 2006).

Serratia marcescens é a espécie mais importante do género *Serratia*, sendo geralmente associada a vários tipos de infecção nos humanos, em particular pneumonias, septicemias, meningites, endocardites, infecções no sistema urinário e em ferimentos. Esta espécie é reconhecida como um patógeno importante, com propriedades invasoras e tendência para a resistência a muitos dos antibióticos utilizados actualmente (Menezes *et al.* 2004; Vasconcelos *et al.*, 2006).

Na figura 4.9 mostra-se o aspecto da espécie *Serratia marcescens* com aplicação de coloração de Gram, com aplicação de violeta de cristal, iodo de Gram, descoloração e corante de contraste de safranina, (procedimento de coloração de Gram) (University of Lethbridge). Pela comparação da figura 4.4 (c) com a figura 4.9, podem observar-se várias semelhanças relativamente à forma e coloração de Gram deste tipo de bactérias.

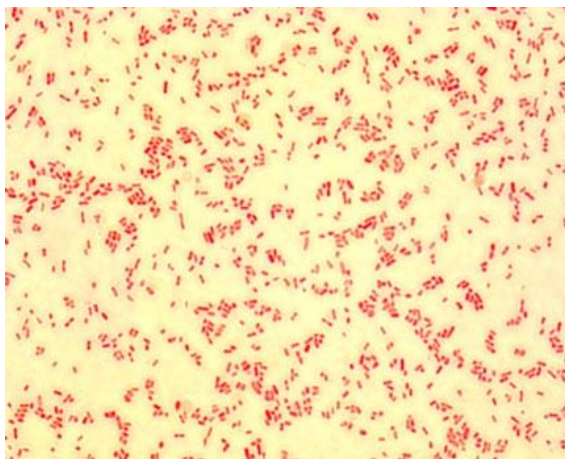


Figura 4.9 – *Serratia marcescens* com coloração de Gram (ampliação 1000x) (Fonte: University of Lethbridge)

O género *Kluyvera* tal como o género *Serratia*, tratam-se de bactérias Gram negativas facultativamente anaeróbias da família das *Enterobacteriaceae*, que podem ser encontradas nos alimentos, solo e águas residuais. Para além disso, este género é patógeno oportunista para os humanos (Biblioteca Virtual em Saúde, 2010).

Existem, no entanto, algumas limitações do teste de API que podem afectar de várias formas os resultados obtidos. Uma dessas limitações diz respeito ao sistema API 20 E, apenas se destinar à identificação das *Enterobacteriaceae* e dos bacilos Gram negativos não fastidiosos presentes na base de dados e apenas a estes, não podendo ser utilizado para identificar outros microrganismos ou excluir a sua presença. Outra das limitações é que podem ser observadas discordâncias em relação às técnicas convencionais devidas às diferenças de princípio das reacções utilizadas na técnica API, podendo para além disso

observar-se desvios nas percentagens obtidas, causados pelas variações dos substratos utilizados. Por fim, salienta-se um aspecto extremamente importante que consiste na utilização de apenas culturas puras (culturas que contenham um único tipo de microrganismo).

Pelo método da coloração de Gram, verificou-se que os microrganismos presentes nas culturas finais obtidas para identificação, eram maioritariamente Gram positivos. Utilizou-se no entanto este kit para *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativos não fastidiosos, devido à pesquisa bibliográfica que se realizou inicialmente ter indicado que grande parte dos organismos presentes em águas residuais, pertenciam a estes grupos.

Os bacilos Gram negativos pertencentes à família das enterobactérias, como são habitualmente conhecidas, são as bactérias isoladas com mais frequência em amostras biológicas. Estes microrganismos estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados no solo, água, plantas e principalmente no cólon dos seres humanos e outros animais, sendo em muitos casos constituintes da flora normal (Instituto Superior de Ciências da Saúde – Sul, 2010; Vasconcelos *et al.*, 2006).

De qualquer forma, seria aconselhada a utilização de dois kits, um kit para Gram negativas e outro para Gram positivas. No entanto, este kit apenas dá resposta dos microrganismos Gram negativos presentes na amostra.

Para além disso, tal como foi referido anteriormente, e como se pôde verificar através da observação microscópica, não foi possível dentro do tempo da actividade experimental, obter culturas puras dos organismos utilizados para identificar. Considera-se assim, que este terá sido o principal factor de possível erro nos resultados obtidos. No entanto, também segundo informações da BioMérieux, o kit indica os resultados da espécie presente em quantidade mais significativa na amostra.

Para além disso, segundo informações da mesma fonte, o tempo de incubação das galerias poderá ter sido insuficiente (24 horas) podendo mascarar os resultados. Apesar de nas indicações do protocolo do mesmo fornecedor, o tempo de incubação aconselhado ser entre 18 a 24 horas, desde que houvesse pelo menos três resultados positivos em cada galeria, tal como se verificou.

4.3. MALDI-TOF MS

Para além do estudo elaborado nesta dissertação de comparação de métodos de identificação de bactérias floculentas presentes em sistemas de lamas activadas de ETAR, em paralelo foi elaborado outro de identificação de bactérias filamentosas. Na figura 4.10

encontra-se o gel obtido após coloração e respectiva descoloração, de ambos os estudos elaborados. No entanto, neste estudo apenas vamos abordar os resultados referentes à identificação das bactérias floculentas, ou seja no caso do gel, referentes às pistas 6, 7, 8 e 9 da figura 4.10.

No passo de extracção das proteínas, após a desnaturação e respectiva centrifugação das proteínas para separação destas, obteve-se um sobrenadante correspondente à fracção de proteínas solúveis e um *pellet* correspondente à fracção de proteínas insolúveis. Utilizaram-se estas duas fracções para correr no gel previamente preparado. Na pista 8 correu-se a fracção de proteínas solúveis e na pista 9 a fracção de proteínas insolúveis. Para além disso, realizou-se uma diluição de 1:10 das anteriores fracções para se obterem bandas menos concentradas, tendo-se corrido a fracção de proteínas solúveis diluída na pista 6 e a fracção de proteínas insolúveis diluída na pista 7.

A pista 1 corresponde ao padrão LMW (Amersham, EUA), constituído por proteínas de pesos moleculares bem conhecidos, que se apresentam na tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Padrão LMW (14 000 – 97 000 Da)

Origem	Proteína	Peso molecular (KDa)
Músculo de rato	Fosforilase b	97
Soro de bovino	Albumina	66
Clara de ovo de galinha	Ovalbumina	45
Eritrócito de bovino	Anidrase carbónica	30
Soja	Inibidor da tripsina	20,1
Leite de bovino	α -Lactoalbumina	14,4

A proteína seleccionada para análise através do MALDI-TOF MS, corresponde à proteína da pista 9 diferenciada por um rectângulo a vermelho. Com recurso ao padrão LMW determinou-se o peso molecular aparente desta, que é de aproximadamente 97 KDa, como se mostra na figura 4.10.

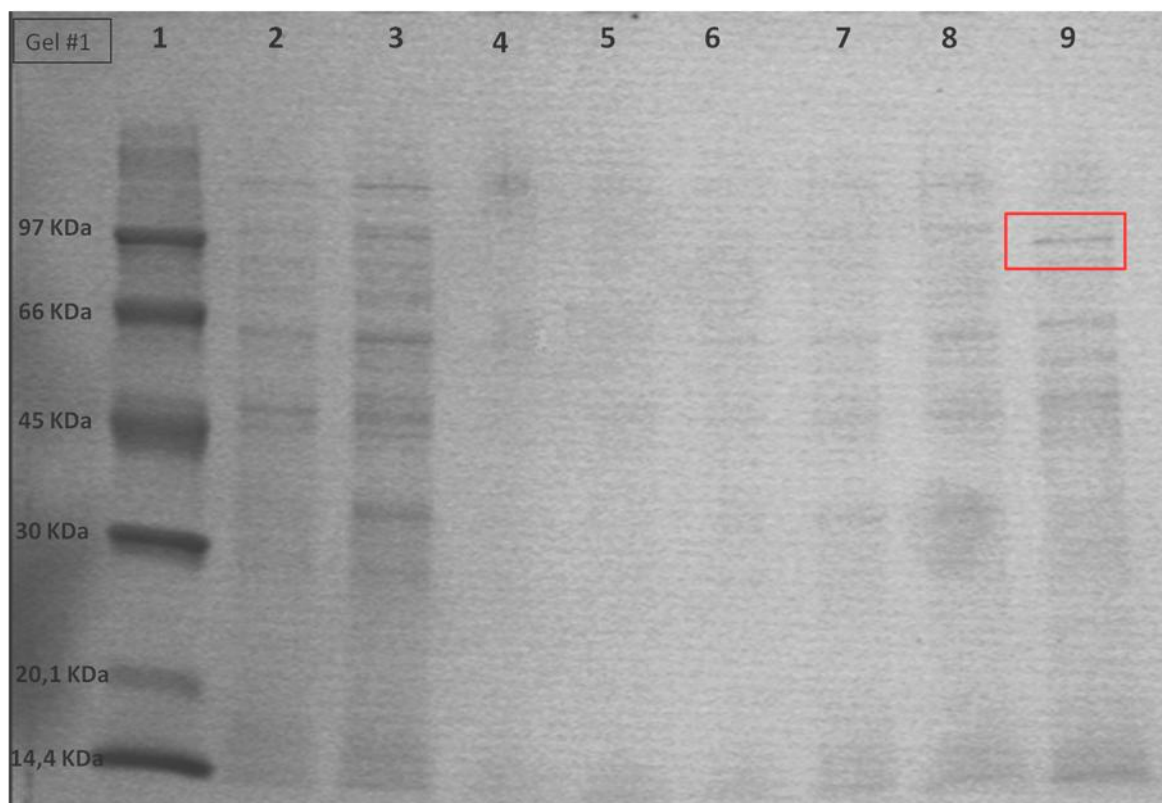


Figura 4.10 – Gel#1 – Fosforilase b (97 KDa); Albumina (66 KDa); Ovalbumina (45 KDa); Anidrase carbónica (30 KDa); Inibidor da tripsina (20,1 KDa); α -Lactoalbumina (14,4 KDa); Pista 1: Padrão LMW; Pista 2: Fracção proteínas solúveis M1; Pista 3: Fracção proteínas insolúveis M1; Pista 4: Fracção proteínas solúveis M1 (diluído 1:10); Pista 5: Fracção proteínas insolúveis M1 (diluído 1:10); Pista 6: Fracção proteínas solúveis I1 (diluído 1:10) ; Pista 7: Fracção proteínas insolúveis I1 (diluído 1:10); Pista 8: Fracção proteínas solúveis I1; Pista 9: Fracção proteínas insolúveis I1

Na figura 4.11 mostram-se os espectros de massa e os espectros de massa-massa obtidos em MALDI TOF-TOF MS. O primeiro dos espectros representados diz respeito ao espectro de massa dos fragmentos peptídicos da proteína digerida e seleccionada para análise em *Peptide Mass Finger Print*. Neste, encontram-se os picos de iões monoisotópicos com os respectivos valores de massa de cada um dos fragmentos peptídicos obtidos. Os restantes espectros dizem respeito aos espectros de massa-massa, obtidos da fragmentação dos picos do espectro de massa anterior, adquiridos com recurso a um analisador TOF/TOF.

O número de fragmentos peptídicos adquirido pelo espectro de massa foi reduzido, tendo-se no entanto considerado suficiente para fazer a pesquisa por MASCOT.

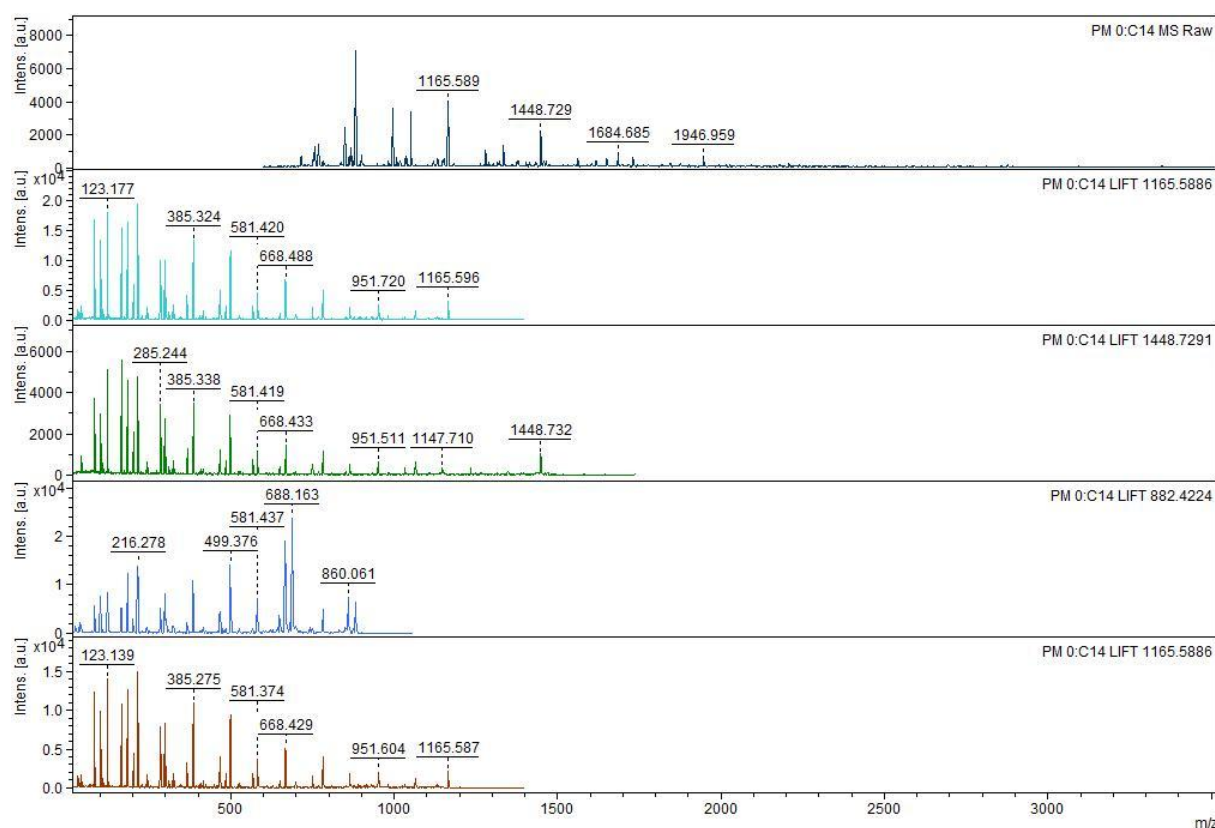


Figura 4.11 – Espectro de massa (MS) e espectros de massa-massa (MS-MS) obtidos

Na tabela 4.5 apresenta-se uma lista das proteínas identificadas através do software Mascot, e as correspondentes espécies prováveis de presença na amostra analisada. Para além disso, apresenta-se também um valor probabilístico dado pelo programa, o Mascot score, cujos valores acima de 30 são considerados aceitáveis, a percentagem de cobertura da sequência e a correspondência de péptidos. Quanto mais elevado é o Mascot score, a percentagem de cobertura de sequência e a correspondência de péptidos, maior é a probabilidade de identificação de uma proteína, que corresponde a uma determinada espécie. A proteína Putative acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase (PM2;L6) é a que apresenta um Mascot score, percentagem de cobertura de sequência e correspondência de péptidos, superior. No entanto, há que considerar também a massa teórica dessas proteínas. Tal como referido anteriormente a proteína seleccionada do gel para análise, tinha um peso molecular aparente de aproximadamente 97 KDa. Desta forma, considera-se que apenas as espécies *Lentisphaera araneosa* e *Serratia* sp. são possíveis de estar presentes na amostra, dado que são as duas que apresentam pesos moleculares mais próximos de 97 KDa e que apresentam um Mascot score aceitável, de 53.

Segundo o método de API e de MALDI-TOF MS, o género *Serratia* foi identificado, estando por isso de alguma forma estes dois métodos em concordância nos resultados obtidos.

Tabela 4.5 – Correspondência e cobertura da sequência de péptidos da digestão em gel através do software Mascot

Proteína identificada	Espécie	Massa teórica (Da)	Mascot score	Cobertura da sequência (%)	Correspondência de péptidos
Putative acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase (PM2;L6) Poly(A) polymerase I (PAP) (PIML6,5)	<i>Bacillus cereus</i>	49830	72	11	5
Hypothetical protein LNTAR_05959	<i>Acinetobacter</i> sp.	55623	62	8	4
	<i>Lentisphaera araneosa</i>	81679	53	6	4
Protein piGD	<i>Serratia</i> sp.	96977	53	6	4

A técnica de ionização de MALDI tolera uma quantidade razoável de impurezas na amostra a analisar (Guerrera e Kleiner, 2005). No entanto, da mesma forma do que para o método API, a não utilização de uma cultura pura para identificação dos microrganismos presentes, deverá ter sido o principal motivo por possíveis erros nos resultados obtidos através deste método, não sendo os resultados obtidos 100% conclusivos. Na banda seleccionada para análise, será de considerar uma eventual sobreposição de bandas que podem corresponder a proteínas de peso molecular muito semelhante da mesma espécie ou de mais de que uma espécie de microrganismos, afectando os resultados obtidos.

5. ANÁLISES SWOT

Nas tabelas 5.1, 5.2 e 5.3 apresentam-se sintetizadas através de análises SWOT os pontos fortes, os pontos fracos, as oportunidades e as ameaças de cada um dos métodos utilizados: microscopia, API e MALDI-TOF MS.

Tabela 5.1 – Análise SWOT para o método microscopia óptica

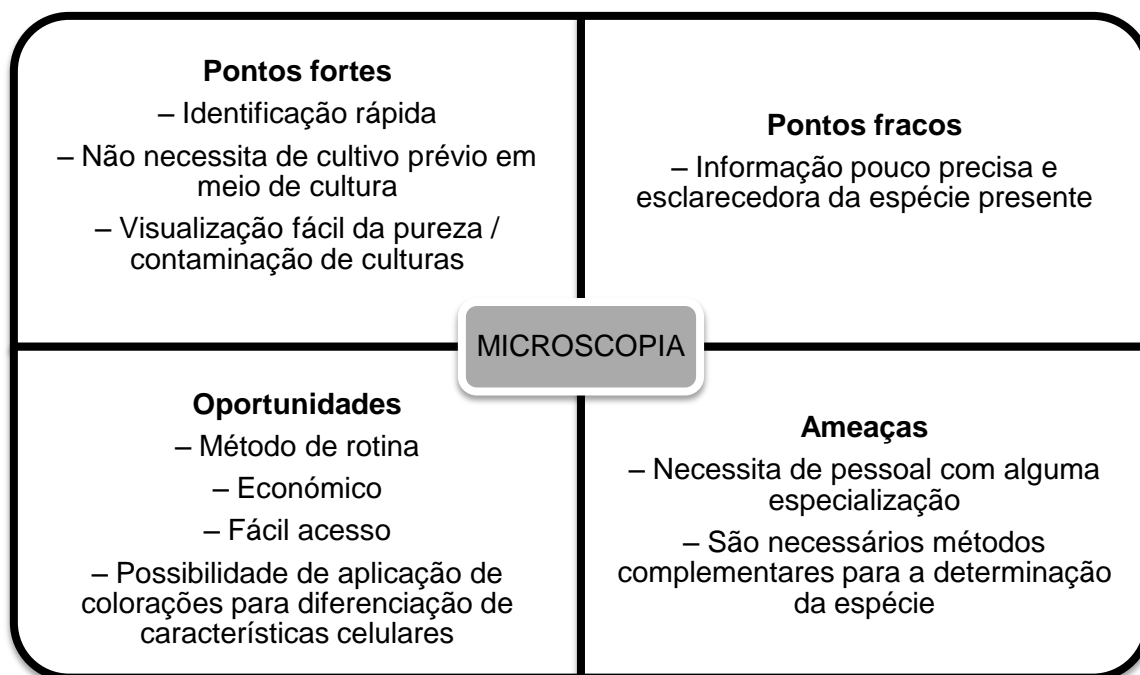


Tabela 5.2 – Análise SWOT para o método API

<p>Pontos fortes</p> <ul style="list-style-type: none"> – Informação precisa, ao nível da espécie – Informação sobre características metabólicas (produção de indol, oxidação da glucose, etc) – Resultados obtidos num curto período de tempo 	<p>Pontos fracos</p> <ul style="list-style-type: none"> – Necessita de cultivo prévio em meio de cultura
<p>Oportunidades</p> <ul style="list-style-type: none"> – Método de rotina – Relativamente económico – Não necessita de pessoal especializado – Tempo de formação muito curto 	<p>Ameaças</p> <ul style="list-style-type: none"> – Necessita de uma cultura pura para obtenção de resultados 100% conclusivos – Permite apenas a identificação das espécies presentes na base de dados, e apenas a estas

API

Tabela 5.3 – Análise SWOT para o método MALDI-TOF MS

<p>Pontos fortes</p> <ul style="list-style-type: none"> – Informação muito detalhada e complexa – Permite chegar à informação não apenas da espécie, mas também das massas dos fragmentos peptídicos e das respectivas sequências peptídicas 	<p>Pontos fracos</p> <ul style="list-style-type: none"> – Necessita de cultivo prévio em meio de cultura – Método de preparação da amostra muito complexo e demorado
<p>Oportunidades</p> <ul style="list-style-type: none"> – Estudo de possíveis alterações nas proteínas e nas características metabólicas dos organismos – Relacionamento dessas alterações com os processos de tratamento das ETAR e com o ambiente 	<p>Ameaças</p> <ul style="list-style-type: none"> – Necessita de uma cultura pura para obtenção de resultados 100% conclusivos – Difícil acesso – Custos elevados – Não é um método de rotina – Requer pessoal muito especializado

MALDI-TOF

6. CONCLUSÕES

Em sistemas de tratamento de águas residuais, nomeadamente em sistemas de lamas activadas, as lamas são constituídas por uma população heterogénea de microrganismos, que está em contínua modificação, devido a alterações na composição do efluente ou dos parâmetros de funcionamento. O controlo destas alterações permite criar pressões selectivas que irão favorecer o crescimento de microrganismos desejáveis em detrimento de outros. Desta forma, a identificação dos microrganismos presentes nas lamas e das suas características metabólicas torna-se muito importante (Metcalf e Eddy, 2003; Santos Oliveira, 1982).

Este trabalho teve como objectivo a comparação de métodos de identificação de bactérias formadoras de flocos. Para tal, foram comparados três métodos (i) a observação microscópica, (ii) os API e o (iii) MALDI-TOF MS.

Por mais complexo que seja o método de identificação, é importante realçar que para qualquer um deles é fundamental a obtenção de uma cultura pura previamente à identificação dos microrganismos pretendidos, de forma a serem atingidos resultados 100 % conclusivos (Busse *et al.*, 1996).

Uma das ferramentas mais utilizada para conhecer o estado das lamas de um reator biológico, e que deve ser utilizada diariamente, é a observação microscópica. Uma examinação frequente deste tipo, permite diagnosticar alterações da biomassa do tanque de arejamento, prever o seu aparecimento e verificar possíveis alterações do desempenho do processo, de forma a identificar se necessário uma acção correctiva previamente a um problema mais severo. Para auxílio da visualização microscópica normalmente utilizam-se corantes, conseguindo-se assim realçar mais facilmente as características dos microrganismos presentes nas lamas (Eckenfelder *et al.*, 1986; Lactema, 2010; Metcalf e Eddy, 2003).

Observou-se microscopicamente a lama com e sem recurso a colorações. As colorações utilizadas foram coloração com hematoxilina e eosina, e coloração de Gram. Inicialmente observou-se a lama sem coloração o que permitiu verificar que nesta estavam presentes diversas espécies de microrganismos, sendo possível a distinção de vários filamentos e agregados. À medida que se realizaram re-inoculações da amostra, em novos meios de cultura e com recurso às colorações foi possível verificar que as amostras ainda não se encontravam puras, podendo verificar-se ainda espécies de microrganismos diferentes na mesma lâmina. Para além disso, pôde verificar-se também através da coloração de Gram, que se encontravam presentes principalmente dois tipos de bactérias, maioritariamente

Gram positivas, mas também algumas Gram negativas, sendo também a forma delas diferente (figuras 4.4. (a), (b) e (c)).

Para o método de API, foi utilizado o kit API 20 E para *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativos não fastidiosos. Através deste método identificou-se presumivelmente dois possíveis géneros para as amostras de culturas finais obtidas, o género *Serratia* e o género *Kluyvera*, com uma percentagem de probabilidade bastante elevada e segundo dois programas de identificação, o apiweb da BioMérieux e o ABIS online. Foi escolhido este kit para bactérias Gram negativas, apesar de se considerar que seria também aconselhada a utilização de um kit para Gram positivas, de forma a obterem-se e compararem-se mais resultados.

Em relação ao método de MALDI-TOF MS para além de não ter sido possível dentro do tempo da actividade experimental, a obtenção de uma cultura pura, também não houve oportunidade para otimizar em tempo útil este método, tendo-se apenas realizado uma tentativa de análise.

Tal como se pôde constatar através da observação microscópica realizada, as culturas finais obtidas para identificação através dos métodos de API e MALDI-TOF MS não eram puras. Considera-se que esta foi a maior dificuldade e limitação deste trabalho, uma vez que tal como anteriormente referido, é fundamental a obtenção de uma cultura pura, para a obtenção de resultados 100 % conclusivos. Deste modo, considera-se que os resultados obtidos através dos métodos de API e MALDI-TOF MS possam estar mascarados devido a esta limitação.

Em suma, em relação aos métodos utilizados, pode concluir-se que qualquer um dos métodos é útil e importante para a identificação de microrganismos, e que estes se complementam entre si. A microscopia torna-se útil mas obtém-se uma análise pouco detalhada e complexa, e os API fornecem uma informação mais completa e precisa sobre os microrganismos a identificar. E por fim, o MALDI-TOF MS fornece informação muito detalhada e complexa relativamente à identidade de presumíveis proteínas pertencentes aos microrganismos analisados.

Assim, considera-se que primeiramente em qualquer trabalho é extremamente importante definir o âmbito, a qualidade e o grau de detalhe da informação pretendida, dado que diferentes métodos fornecem diferentes graus de detalhe de informação. No entanto, pensa-se que em engenharia sanitária, em situações correntes de identificação de microrganismos, será pouco útil a utilização de métodos muito complexos e que fornecem informação demasiadamente detalhada, como é o caso do MALDI-TOF MS.

No entanto, e visto que a espectrometria de massa mede o peso molecular das proteínas e de péptidos, é o método de escolha para detecção e caracterização de modificações pós-translacionais e potencialmente pode identificar qualquer modificação covalente que altere a massa da proteína (Mann *et al.*, 2001). Uma metodologia como a do MALDI-TOF MS seria útil em estudos avançados de investigação em engenharia sanitária (e não rotineiros numa ETAR), para analisar possíveis alterações nas proteínas de microrganismos, sob influência de poluentes, como por exemplo compostos disruptores endócrinos ou nanopartículas. Esses trabalhos permitiriam estudar a influência que essas alterações nas proteínas poderiam ter nos processos de tratamento ou mesmo no ambiente.

Perspectivas de Trabalho Futuro

Uma vez que a obtenção de culturas puras foi a principal limitação deste trabalho, considera-se que seria interessante futuramente estudarem-se metodologias eficazes para a obtenção de culturas puras, como por exemplo a utilização e teste de vários meios selectivos, dado que apenas se utilizou uma receita. Outro exemplo, seria testarem-se alguns antibióticos e estudar qual o mais aconselhado para posterior selecção dos microrganismos pretendidos – organismos floculentos.

Essencialmente e em resumo, seria necessária a elaboração e aplicação de uma estratégia de purificação mais precisa, de forma a seleccionarem-se os organismos pretendidos e se obterem culturas puras.

Em relação à análise de MALDI-TOF MS, futuramente poderia criar-se uma estratégia para otimizar os resultados obtidos, através da criação de uma forma de redução da complexidade da amostra, recorrendo a estratégias de fraccionamento e depleção. Poderia, ainda optimizar-se a densidade do gel de modo a permitir uma melhor definição e separação das bandas correspondentes às proteínas em estudo.

Seria também extremamente interessante avaliar através da metodologia MALDI-TOF MS, possíveis alterações nas proteínas de microrganismos presentes em ETAR e outros ambientes, sob influência de poluentes, como por exemplo compostos disruptores endócrinos ou nanopartículas. Esses trabalhos permitiriam estudar a influência que essas alterações nas proteínas poderiam ter nos processos de tratamento ou mesmo no ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELHO, M. (2010) *Protocolos de Microbiologia Ambiental – Parte 1: métodos básicos em microbiologia*, Escola superior Agrária de Coimbra

ABIS ONLINE – Bacteria Identification Software, Disponível em: http://www.tgw1916.net/bacteria_logare.html, último acesso Setembro de 2010

BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE, Descritores em Ciências da Saúde, Disponível em: <http://decs.bvs.br/>, último acesso Setembro de 2010

BIOMÉRIEUX, Disponível em: <http://www.biomerieux.pt>, último acesso Maio de 2010

BUSSE, H. J., DENNER, E. B. M., LUBITZ, W., (1996) *Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematic*, Journal of Biotechnology, **47**: 3 – 38

CAPELO, J. L., CARREIRA, R., DINIZ, M., FERNANDES, L., GALESIO, M., LODEIRO, C., SANTOS, H. M., VALE, G., (2009) *Overview on modern approaches to speed up protein identification workflows relying on enzymatic cleavage and mass spectrometry-based techniques*, Analytica Chimica Acta, **650**: 151 – 159

CHAIGNON, V., LARTIGESA, B. S., EL SAMRANIA, A., MUSTIN, C., (2002) *Evolution of size distribution and transfer of mineral particles between flocs in activated sludges: an insight into floc exchange dynamics*, Water Research, **36**: 676 – 684

COICO, R., (1997) *Current Protocols in Immunology*, Gram Staining, Apêndice 30, A.30.1 – A.30.2, Suplemento 23, John Wiley & Sons Inc, New York

DIÁRIO DA REPÚBLICA, Decreto-Lei nº 152/97, DIÁRIO DA REPÚBLICA – I SÉRIE – A, Nº 139 – 19-6-1997, 2959

ECKENFELDER, W. W., FORD, D. L., LANKFORD, P. W., SHELL, G., SULLIVAN, D. L., (1986) *Operation, Control & Management of Activated Sludge Plants Treating Industrial Wastewaters*, Vanderbilt University School of Engineering, Nashville, Tennessee

ELLIS, R., *GRAM Micro-Organisms Staining Protocol*, IHCWORLD – Life Science Information Network, Disponível em: http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/gram_ellis.htm, último acesso Setembro de 2010

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO (2006/2007) *Cultura de Microrganismos – Provas Bioquímicas*, Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

FITCH, M. W., PEARSON, N., RICHARDS, G. BURKEN, J., G. (1998) *Biological fixed-film systems*, Water Environment Research, Vol. 70, No. 4, pp. 495 – 518

GRADY, C. P. L., LIM H. C. (1980) *Biological wastewater treatment – Theory and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York

GRAY, N. F., (2004) *Biology of wastewater treatment*, Series on environmental science and management – Vol. 4, Imperial College Press, University of Dublin, Ireland, 2º Edição

GUERRERA, I., C., KLEINER, O., (2005) *Application of Mass Spectrometry in Proteomics*, Bioscience Reports, **25**: 71 – 93

HENZE, M., HARREMOËS, P., JANSEN J. C., ARVIN E. (1997) *Wastewater treatment – Biological and Chemical Processes*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York, 2º Edição

HOLMES, B., WILLCOX, W. R., LAPAGE, S. P. (1978) *Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system*, Journal of Clinical Pathology, 31: 22 – 30

INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – SUL Capítulo 8 – *Estudo bioquímico e metabólico de bacilos de Gram negativo*, Manual Prático de Microbiologia, Instituto Superior de Ciências da Saúde – Sul

JIN, B., WILÉN, B. M., LANT, P., (2003) *A comprehensive insight into floc characteristics and their impact on compressibility and settleability of activated sludge*, Chemical Engineering Journal, **95**: 221 – 234

JUANG, D. F., MORGAN, J.M., (2001) *The applicability of the API 20E and API Rapid NFT systems for the identification of bacteria from activated sludge*, Electronic Journal of Biotechnology, Electronic Journal of Biotechnology, ISSN: 0717 – 3458, Vol.4 No.1

LACTEMA – Laboratórios Técnicos de Produtos de Manutenção e Segurança, Lda, Disponível em: <http://www.latecma.com>, último acesso Agosto de 2010

LEWIS, J. K., WEI, J., SIUZDAK, G., (2000) *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis*, In Encyclopedia of Analytical Chemistry, R.A. Meyers (Ed.), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 5880 – 5894

LOPES, A. M., FONSECA, Á., (1996), *Biologia microbiana*, Universidade Aberta, Lisboa, 1º Edição

MANN, M., HENDRICKSON, R. C., PANDEY, A., (2001) *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry*, Annual Review of Biochemistry, **70**: 437 – 473

MASCOT – MATRIX SCIENCE, Disponível em: http://www.matrixscience.com/search_form_select.html, último acesso Outubro de 2010

MENEZES, E. A., CEZAFAR, F. C., ANDRADE, M. S. S., ROCHA, M. V. A. P., CUNHA, F. A. (2004) *Frequência de Serratia sp em Infecções Urinárias de pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia em Fortaleza*, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Vol. 37 No. 1, Uberaba Jan./Feb., ISSN 0037-8682

METCALF, EDDY, Inc., (2003) *Wastewater Engineering – Treatment and Reuse*, McGraw-Hill Higher Education, New York, 4ª Edição

NATIONAL BANK FOR INDUSTRIAL MICROORGANISMS AND CELL CULTURES, Disponível em: <http://www.nbimcc.org/cabricat/media.php>, último acesso Agosto de 2010

OLIVEIRA, A. I. S., (2008) *Guia Metodológico de Manuais de Exploração de ETAR's*, Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa

RIAL-OTERO, R., CARREIRA, R. J., CORDEIRO, F.M., MORO, A.J., SANTOS, H.M., VALE, G., MOURA, I., CAPELO, J.L. (2007) *Ultrasonic Assisted Protein Enzymatic Digestion for Fast Protein Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry: Sonoreactor versus Ultrasonic Probe*, Journal of Chromatography A, Vol. 1166, Issues 1 – 2, pp. 101 – 107, DOI: 10.1016 / j.chroma.2007.08.013

PHARMANESS Neuroscience – *Hematoxylin Eosin*, Disponível em: <http://pharmaness.com>, último acesso Setembro de 2010

SANTOS, M. C. R., (2009) *Ensaio Laboratorial de Decantação Retardada*, Laboratórios de Operações Unitárias em Engenharia Sanitária, Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa

SANTOS OLIVEIRA, J. (1982) *Operações e Processos Fundamentais em Engenharia Sanitária – Fundamentos de Depuração Biológica*, Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa 1º Edição

SCHRYVER, P., CRAB, R., DEFOIRDT, T., BOON, N., VERSTRAETE, W., (2008) *The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture*, Aquaculture, **277**: 125 – 137

SHEVCHENKO, A., TOMAS, H., HAVLIS, J., OLSEN, J. V., MANN, M. (2006) *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*, Nature Protocols, Vol. 1, No. 6, 2856 – 2860

SIGMA-ALDRICH, Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com>, último acesso Agosto de 2010

SODA, S., IKE, M., FUJITA, M., (1999) *Adsorption of Bacterial Cells onto Activated Sludge Flocs*, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 87, No. 4, 513 – 518

UNIVERSITY OF FLORIDA, College of Medicine, Medical Informatics, *Histological Stains* Disponível em: <http://medinfo.ufl.edu/~dental/denhisto/stains.html>, último acesso Setembro de 2010

UNIVERSITY OF LETHBRIDGE *Photomicrographs from Biology 3200 Laboratory – Gram stain of Serratia marcescens cells*, Disponível em: <http://people.uleth.ca/~selibl/Biol3200/Morphology04/SmGS.html>, último acesso Setembro de 2010

VASCONCELOS, F. F., MENEZES, E. A., CUNHA, F. A., SALVIANO, M. N. C., ÂNGELO, M. R. F., OLIVEIRA, I. R. N. (2006) *Perfil de resistência da bactéria da espécie Serratia marcescens isolada de infecções hospitalares no Hospital Geral de Fortaleza (H.G.F.)*, RBAC, Vol. 38 (1): 35 – 37